

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



X-53-394229-1

***TESIS DOCTORAL***

**IMPLICACIONES FUNCIONALES DEL RECEPTOR DELTA**

**OPIOIDE DURANTE EL DESARROLLO EN LA RATA.**

**INTERACCIONES CON OTROS TIPOS**

**DE RECEPTORES OPIOIDES.**

**BEATRIZ FERNÁNDEZ DE FRUTOS**

**MADRID, 1999**



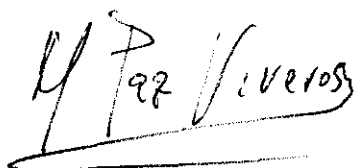
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DPTO. DE BIOLOGÍA ANIMAL II (FISIOLOGÍA ANIMAL)**

***TESIS DOCTORAL***

**IMPLICACIONES FUNCIONALES DEL RECEPTOR DELTA  
OPIOIDE DURANTE EL DESARROLLO EN LA RATA.  
INTERACCIONES CON OTROS TIPOS  
DE RECEPTORES OPIOIDES.**

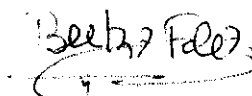
**Madrid, 1999**

**Vº Bº Directora**



**Dra. M<sup>a</sup> Paz Viveros Hernando**

**Doctoranda**



**Beatriz Fernández de Frutos**

Este trabajo se inscribe en el contexto del Proyecto de Investigación BMH4-CT96-0510,DG12-SSMA subvencionado por la Comisión Europea. Beatriz Fernández de Frutos ha sido becaria en dicho Proyecto durante la realización de esta Tesis Doctoral.

*A mis padres.*

*A José Luís.*

## AGRADECIMIENTOS

A menudo me considero una privilegiada por las cosas que la vida me ha concedido. Una de estas cosas sin duda ha sido la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral y lo que es más importante, que haya sido dirigida por la Dra. M<sup>a</sup> Paz Viveros Hernando. Su labor de dirección ha sido excelente, demostrando su gran capacidad de trabajo, su pasión por la ciencia, rigor científico e inteligencia. Además ella me ha brindado su amistad y esto ha sido muy importante para mí. Me ha ayudado siempre en todo lo que he necesitado, a todos los niveles. Le agradezco profundamente todo lo que ha hecho por mí.

Mis compañeros de laboratorio Mayte, Israel y Eva han sido imprescindibles para la correcta realización de este trabajo. Con ellos he compartido muchas horas de laboratorio que sin duda se han hecho más llevaderas, aunque la mayor parte de las veces el trabajo experimental se ha desarrollado en silencio, pero ahí estaban ellos. A los tres mi agradecimiento por su ayuda.

Marisa ha hecho que todo fuera mucho más divertido. Su generosidad y su alegría han sido fundamentales. Además ella ha solucionado todos los problemas, aparentemente irresolubles, que le he planteado. Le agradezco que sea como es.

Mil gracias a Isabel Lizarraga, que siempre se ha interesado por esta Tesis Doctoral. Por muchas razones estoy orgullosa de ser su amiga.

Para la realización de los experimentos de esta Tesis he pasado la mayor parte del tiempo en el animalario. Eva, M<sup>a</sup> Jesús y Jose han facilitado extraordinariamente mi trabajo allí. Mi gratitud no sólo por esto, sino por haber hecho de los ratos libres momentos muy agradables.

Mi agradecimiento al Dr. Ramos y su equipo, a la Dra. Guaza y al Dr. Kitchen por su generosa colaboración en esta Tesis Doctoral y la amabilidad con la que me han tratado.

Mi familia ha estado en todo momento pendiente del desarrollo de este trabajo, especialmente mis padres. Me han aconsejado sabiamente y siempre me han apoyado en las decisiones que he tomado. Me faltan palabras para agradecerles todo lo que me han dado en esta vida.

José Luís ha sido imprescindible en todo esto. Él ha sacrificado conmigo prácticamente todos los fines de semana durante 3 años y sin embargo jamás le he oído una queja, más bien al contrario, siempre me ha alentado y ha engrandecido mi trabajo. Él más que nadie sabe todo lo que he sentido en este tiempo, y sus palabras han sido decisivas en muchas ocasiones. Compartir la vida con él ha sido y seguirá siendo un placer.

En fin, mi gratitud a todas las personas que directa o indirectamente han colaborado en la realización de este trabajo. Esta Tesis Doctoral también es suya.

#### PUBLICACIONES DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL:

- Fernández B., Antelo M.T., Kitchen I., Viveros M.P. (1999). Effects of neonatal naltrindole treatment on antinociceptive and behavioral responses to  $\mu$  and  $\kappa$  agonist in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62 (1): 145-149.
- Fernández B., Antelo M.T., Guaza C., Alberti I., Pinillos M.L., Viveros M.P. (1999). Naltrindole administration during the preweanling period and manipulation affect adrenocortical reactivity in young rats. *Dev. Brain Res.* 112: 135-137.
- Fernández B., Alberti I., Kitchen I., Viveros M.P. (1999). Chronic naltrindole administration does not modify the inhibitory effect of morphine on vocalization responses in the tail electric stimulation test in rats. *Neurosci. Lett.* 260: 81-84.
- Fernández B., Alberti I., Kitchen I., Viveros M.P. (1999). Neonatal naltrindole and handling differently affect morphine antinociception in male and female rats. Será publicado en un número especial sobre diferencias sexuales de la revista *Pharmacol. Biochem. Behav.* En prensa.

#### OTRAS PUBLICACIONES EN LAS QUE HA COLABORADO BEATRIZ FERNÁNDEZ DE FRUTOS, RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS DOCTORAL:

- Antelo M.T., Fernández B., Kitchen I., Viveros M.P. (1998). Effects of preweanling chronic naltrindole administration on stress-induced antinociceptive responses in rats. *Dev. Brain Res.* 110: 127-130.
- Alberti I., Fernández B., Alguacil L.F., Aguilar A., Caamaño M., Romero E.M., Viveros M.P. (1999). Preweanling naltrindole administration differentially affects clonidine induced antinociception and plasma adrenaline levels in male and female neonatal rats. *Br. J. Pharmacol.* En prensa.

## RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral, que se inscribe en el contexto del Proyecto Europeo BMH4-CT96-0510, DG12-SSMA, se han analizado las implicaciones funcionales del receptor  $\delta$  opioide, particularmente en la modulación de respuestas antinociceptivas y comportamentales, así como en la actividad del eje hipofisario-adrenal. Se ha prestado una especial atención a las respuestas de las ratas durante el período postnatal temprano, analizándose también durante este período las interacciones funcionales del receptor  $\delta$  con los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  opioides y con sistemas catecolaminérgicos cerebrales, los efectos de la manipulación temprana y la existencia de diferencias sexuales. Se han empleado tratamientos crónicos con el antagonista selectivo del receptor  $\delta$  opioide naltrindol, con el fin de conseguir animales funcionalmente deficientes en dicho receptor. Se utilizaron asimismo agonistas selectivos para los receptores  $\mu$  y  $\kappa$ . Los resultados indican interacciones funcionales entre los receptores  $\delta$  y  $\mu$ , pero no  $\delta$  y  $\kappa$  en la modulación de la antinocicepción y sugieren que los sistemas  $\mu$  y  $\delta$  implicados en la modulación de la antinocicepción son, al menos en parte, distintos de aquellos implicados en las respuestas comportamentales en el campo abierto. Los datos también indican que el receptor  $\delta$ , probablemente en interacción con el sistema dopaminérgico, está implicado en la modulación tónica de la actividad motora durante el período neonatal. La manipulación neonatal modificó la sensibilidad a estímulo térmico, las respuestas analgésicas a morfina y la actividad del eje hipofisario adrenal en ratas neonatales. Se han observado dimorfismos sexuales durante el período neonatal en una gran parte de los parámetros analizados en esta Tesis Doctoral. Los tratamientos neonatales con naltrindol no se tradujeron en efectos a largo plazo sobre el comportamiento de los animales adultos, y los datos muestran que, en edad adulta el receptor  $\mu$ , sin aparente contribución del receptor  $\delta$ , está implicado de forma fundamental en el componente afectivo del dolor inducido por estímulo eléctrico.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I.1. SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO (SOE)</b> .....	1
<b>I.1.1. COMPONENTES DEL SOE. RECEPTORES Y PÉPTIDOS</b> .....	1
I.1.1.1. Ligandos endógenos y sus precursores. ....	1
I.1.1.2. Receptores opioides: ligandos, subtipos, distribución y funciones.....	8
Receptores opioides delta ( $\delta$ ). ....	8
Receptores opioides kappa ( $\kappa$ ). ....	13
Receptores opioides mu ( $\mu$ ).....	16
I.1.1.3. Biología molecular de los receptores opioides. ....	20
<b>I.1.2. DESARROLLO ONTOGÉNICO DEL SOE</b> .....	25
<b>I.1.3. PLASTICIDAD DEL SOE. UTILIDAD DE LOS TRATAMIENTOS CON ANTAGONISTAS.</b> ....	27
<b>I.2. INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE DIFERENTES TIPOS DE RECEPTORES OPIOIDES.</b> .....	30
<b>I.3. RELACIONES ENTRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL (HHA) Y EL SOE.</b> .....	39
I.3.1. Desarrollo de la respuesta adrenocortical en la rata. ....	39
I.3.2. Implicación diferencial de los distintos tipos de receptores opioides en la modulación de la respuesta corticoadrenal. ....	40
I.3.3. Efectos de la manipulación neonatal sobre la actividad del eje HHA. ....	43
<b>I.4. MODULACION DE RESPUESTAS COMPORTAMENTALES POR EL SOE. CORRELACIONES NEUROQUÍMICAS.</b> .....	46
I.4.1. Implicación diferencial de diferentes tipos de receptores opioides en la modulación del comportamiento.....	46
I.4.2. Relaciones del SOE con sistemas monoaminérgicos. ....	53
<b>I.5. INFLUENCIA DEL SOE EN EL DESARROLLO SOMÁTICO.</b> ....	57

<b>II. ANTECEDENTES PRÓXIMOS DEL PRESENTE TRABAJO Y JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>70</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
<b>IV.1. ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES.....</b>	<b>75</b>
<b>IV.2. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS CRÓNICOS.....</b>	<b>76</b>
IV.2.1. Tratamiento crónico con naltrindol durante el período neonatal.....	76
IV.2.2. Tratamiento crónico con naltrindol durante la edad adulta.....	78
<b>IV.3. PRUEBAS NOCICEPTIVAS.....</b>	<b>79</b>
IV.3.1. Prueba de inmersión de la cola en agua caliente (I.C).....	79
IV.3.2. Prueba de estimulación eléctrica de la cola (EEC).....	80
<b>IV.4. PRUEBAS COMPORTAMENTALES.....</b>	<b>82</b>
IV.4.1. Tablero de agujeros.....	82
IV.4.2. Campo abierto (tablero sin agujeros).....	86
IV.4.3. Laberinto en cruz.....	86
<b>IV.5. VALORACIÓN DE CORTICOSTERONA.....</b>	<b>88</b>
IV.5.1. Recogida de muestras.....	88
IV.5.2. Análisis de las muestras por radioinmunoanálisis (RIA).....	89
<b>IV. 6. VALORACIÓN DE CATECOLAMINAS.....</b>	<b>90</b>
IV.6.1. Disección de áreas encefálicas.....	90
IV.6.2. Valoración de catecolaminas por HPLC.....	90
<b>IV. 7. EVOLUCIÓN PONDERAL.....</b>	<b>91</b>

IV.8. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	93
IV.8.1. Estudio sobre interacciones funcionales entre diferentes tipos de receptores opioides durante el periodo neonatal. Influencia del sexo y la manipulación.....	93
IV.8.1.1. Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre las respuestas antinociceptivas y comportamentales a agonistas selectivos $\mu$ (alfentanil) y $\kappa$ (CI-977). .....	94
IV.8.1.2. Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre la evolución de las respuestas antinociceptivas al agonista $\mu$ morfina. Efectos de la manipulación de los animales. Diferencias sexuales.....	96
IV.8.2. Implicaciones del receptor $\delta$ en la modulación de la actividad adrenocortical durante el periodo neonatal. Efectos del sexo y de la manipulación.....	99
Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol y de la manipulación sobre la respuesta de corticosterona al estrés.	
IV.8.3. Estudio sobre interacciones funcionales entre receptores $\mu$ - $\delta$ , con especial atención a la dimensión afectiva del dolor, en animales adultos.....	102
Efectos del tratamiento crónico con naltrindol sobre las respuestas antinociceptivas al agonista $\mu$ morfina.	
IV.8.4. Estudio sobre implicaciones funcionales del receptor $\delta$ en el desarrollo y modulación de respuestas comportamentales y fisiológicas al estrés. Correlaciones neuroquímicas.....	105
IV.8.4.1. Efectos de tratamientos agudo y crónico con naltrindol sobre respuestas nociceptivas y comportamentales en animales neonatales.....	105

IV.8.4.2. Efectos a corto plazo del tratamiento crónico con naltrindol en animales adultos.....	106
<p style="padding-left: 40px;">Efectos del tratamiento crónico con naltrindol sobre el comportamiento y los niveles de corticosterona.</p>	
IV.8.4.3. Efectos a largo plazo del tratamiento crónico con naltrindol en animales adultos.....	108
<p style="padding-left: 40px;">Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre el comportamiento y la respuesta de corticosterona al estrés, en ratas adultas.</p>	
IV.8.4.4. Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre los niveles de monoaminas en distintas áreas cerebrales de animales neonatales. Diferencias sexuales.....	111
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
<b>V.1. ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE DIFERENTES TIPOS DE RECEPTORES OPIOIDES DURANTE EL PERÍODO NEONATAL. INFLUENCIA DEL SEXO Y LA MANIPULACIÓN.....</b>	<b>113</b>
<p style="padding-left: 40px;">V.1.1. Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre las respuestas antinociceptivas y comportamentales a agonistas selectivos <math>\mu</math> (alfentanil) y <math>\kappa</math> (CI-977).....</p>	
<p style="padding-left: 40px;">V.1.2. Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre la evolución de las respuestas antinociceptivas al agonista <math>\mu</math> morfina. Efectos de la manipulación de los animales. Diferencias sexuales.....</p>	
<b>V.2. IMPLICACIONES DEL RECEPTOR <math>\delta</math> EN LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADRENOCORTICAL DURANTE EL PERÍODO NEONATAL. EFECTOS DEL SEXO Y DE LA MANIPULACIÓN.....</b>	<b>139</b>

Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol y de la manipulación sobre la respuesta de corticosterona al estrés.

**V.3. ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE RECEPTORES  $\mu$ - $\delta$ , CON ESPECIAL ATENCIÓN A LA DIMENSIÓN AFECTIVA DEL DOLOR, EN ANIMALES ADULTOS. .... 146**

Efectos del tratamiento crónico con naltrindol sobre las respuestas antinociceptivas al agonista  $\mu$  morfina.

**V.4. ESTUDIO SOBRE IMPLICACIONES FUNCIONALES DEL RECEPTOR  $\delta$  EN EL DESARROLLO Y MODULACIÓN DE RESPUESTAS COMPORTAMENTALES Y FISIOLÓGICAS AL ESTRÉS. CORRELACIONES NEUROQUÍMICAS..... 156**

V.4.1. Efectos de tratamientos agudo y crónico con naltrindol sobre respuestas nociceptivas y comportamentales en animales neonatales. .... 156

V.4.2. Efectos a corto plazo del tratamiento crónico con naltrindol en animales adultos. .... 169

Efectos del tratamiento crónico con naltrindol sobre el comportamiento y los niveles de corticosterona.

V.4.3. Efectos a largo plazo del tratamiento crónico con naltrindol en animales adultos. .... 182

Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre el comportamiento y la respuesta de corticosterona al estrés, en ratas adultas.

V.4.4. Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre los niveles de monoaminas en distintas áreas cerebrales de animales neonatales. Diferencias sexuales. .... 195

**V.5. EVOLUCIÓN PONDERAL.....214**

VI. CONCLUSIONES.....	230
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	234

## I. INTRODUCCIÓN

## **I.1. SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO (SOE).**

### **I.1.1. COMPONENTES DEL SOE. RECEPTORES Y PÉPTIDOS.**

El SOE está constituido tanto por los péptidos opioides endógenos como por sus receptores específicos. La investigación llevada a cabo sobre el SOE desde su descubrimiento ha sido muy intensa y pone de manifiesto la intervención de este sistema en una numerosa gama de funciones básicas como el crecimiento y desarrollo, la locomoción, la regulación de la presión sanguínea, la ventilación pulmonar, los comportamientos sexual y reproductivo, los comportamientos agonísticos, funciones inmunológicas, gasto de energía y regulación del comportamiento alimenticio y de la ingesta de sólidos y líquidos, la termorregulación, la diuresis, la respuesta endocrina a estímulos estresantes, sociales y psicológicos y la modulación de la nocicepción. Así pues, el SOE parece estar implicado en una amplia variedad de comportamientos, aunque la naturaleza y extensión de esta implicación no está aún del todo clara. Las acciones opioides que más nos interesan en el contexto de esta Tesis Doctoral, se refieren a la modulación del dolor y respuestas comportamentales y neuroendocrinas a estímulos estresantes.

#### **I.1.1.1. Ligandos endógenos y sus precursores.**

Los primeros ligandos peptídicos endógenos de los receptores opioides fueron aislados y secuenciados a mediados de los años 70. Así, en 1975 se descubrieron las encefalinas (Hughes 1975, Hughes y col. 1975) y en 1976 se encontraron otras sustancias con actividad opioide a las que se denominó endorfinas (Adler 1980, Bradbury y col. 1976, Cox y col. 1976, Guillemin y col. 1976, Li y Chung 1976, Pasternak y col. 1976). Posteriormente, en los años 80, se identificó otro grupo de péptidos a los que denominaron dinorfinas (Goldstein y col. 1981). Actualmente se sabe que estas tres familias de péptidos opioides endógenos, descubiertas en mamíferos, derivan de moléculas proteicas de mayor

tamaño, denominadas precursores. Estos precursores son la proopiomelanocortina, proencefalina A y proencefalina B (prodinorfina) (Kakidani y col. 1982, Nakanishi y col. 1979, Noda y col. 1982). Se ha propuesto que los genes correspondientes a estos tres precursores fueron originados por un mecanismo evolutivo común (Dores y col. 1993).

Recientemente se han descubierto las endomorfina 1 y 2, unos productos opioides sin precursor aún identificado que se han propuesto como ligandos endógenos de alta selectividad por los receptores  $\mu$  (Zadina y col. 1997). Las endomorfina son unos tetrapéptidos aminados no relacionados estructuralmente con los péptidos opioides clásicos. Aunque el estudio de la distribución de estos péptidos está todavía en una fase temprana, parece que la endomorfina 2 se halla en áreas concretas del cerebro de rata, en algunas de las cuales hay una alta densidad de receptores  $\mu$  (Schreff y col. 1998). También se ha detectado la presencia de endomorfina 2 en las neuronas sensoriales primarias y en el asta dorsal de la médula espinal, donde podría estar implicada en la modulación de la entrada de información nociceptiva (Martin-Schild y col. 1997).

La molécula de proopiomelanocortina contiene secuencias para la hormona estimulante de melanocitos  $\gamma$  ( $\gamma$ -MSH), la adrenocorticotropina (ACTH) y la  $\beta$ -lipotropina ( $\beta$ -LPH). A su vez, la ACTH contiene las secuencias para la  $\alpha$ -MSH y el péptido CLIP, y la  $\beta$ -LPH para la  $\beta$ -MSH y las distintas endorfinas, siendo la más importante la  $\beta$ -endorfina (Adler 1980) (Esquema 1, Tabla 1). Se produce un procesamiento específico de tejido en lo referente a la acción de determinadas peptidasas, las modificaciones post-traduccionales y el almacenamiento de las moléculas derivadas de la proopiomelanocortina. Así, en el lóbulo anterior de la hipófisis predomina la ACTH sobre la  $\alpha$ -MSH, mientras que la  $\beta$ -LPH (sin actividad opioide) y la  $\beta$ -endorfina se encuentran en cantidades equimolares. En el lóbulo intermedio, la ACTH y la  $\beta$ -LPH son casi totalmente procesadas hasta la  $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -endorfina, además, esta última puede sufrir modificaciones post-traduccionales para originar otras endorfinas ( $\alpha$ -endorfina,  $\gamma$ -endorfina y N-acetil- $\beta$ -endorfina). En el lóbulo posterior no

hay  $\beta$ -endorfina (Höllt 1991, McDowell y Kitchen 1987, Millan y col. 1991, Zakarian y Smyth 1982). En el encéfalo el procesamiento es similar al del lóbulo intermedio, con un marcado predominio de la  $\alpha$ -MSH y la  $\beta$ -endorfina. La mayor parte de las neuronas que sintetizan  $\beta$ -endorfina se localizan en el núcleo arqueado del hipotálamo. Estas estructuras inervan la eminencia media y otros núcleos hipotalámicos y extrahipotalámicos, estructuras todas ellas implicadas en el control de la secreción hormonal hipofisaria (Civelli y col. 1984, Höllt 1986, Watson y col. 1984).

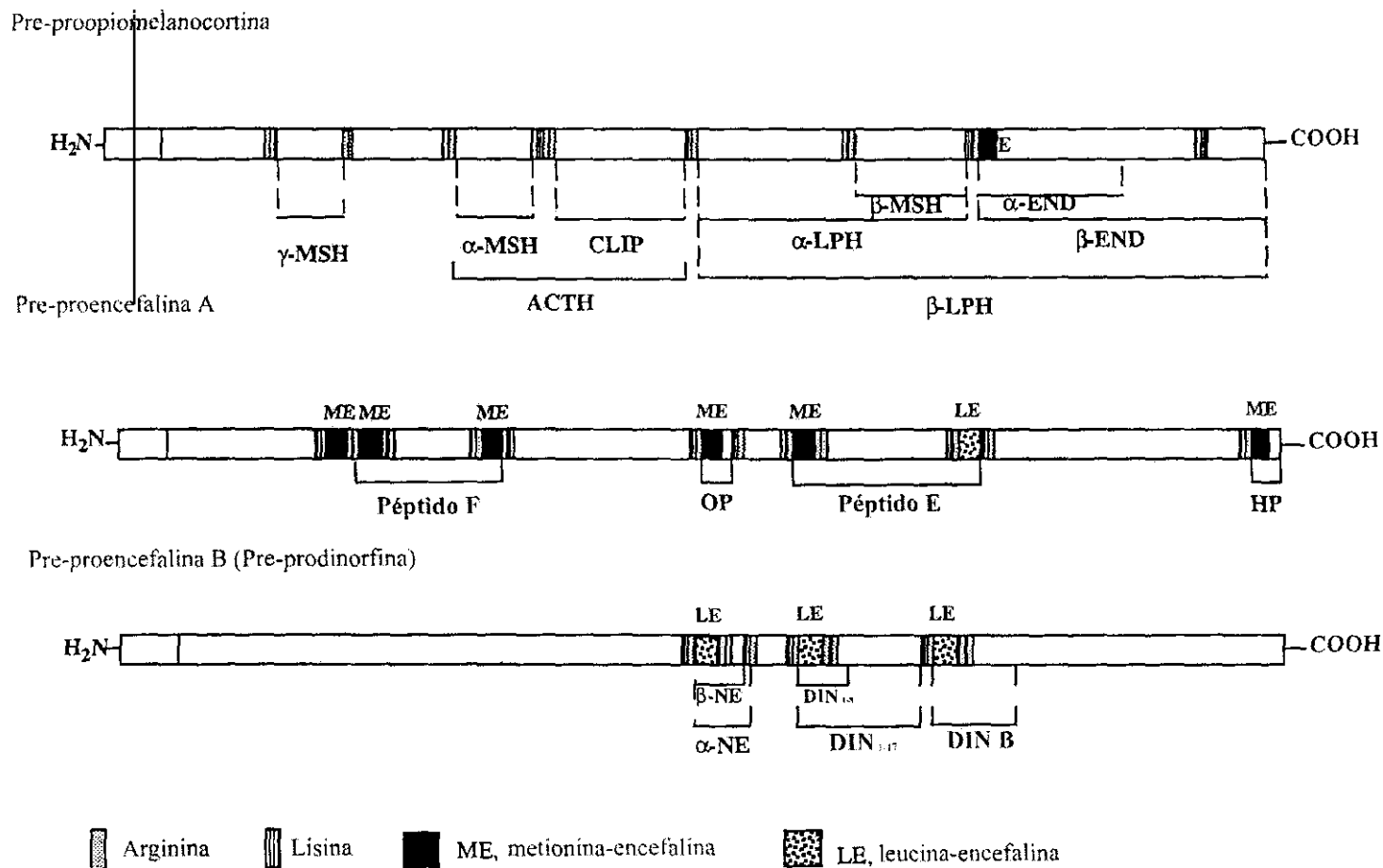
La proencefalina A contiene, entre otras, secuencias para la [Met]-encefalina y la [Leu]-encefalina (Esquema 1, Tabla 1). Estos dos péptidos opioides son secretados en los tres lóbulos hipofisarios. En el encéfalo, las neuronas encefalinérgicas se encuentran ampliamente distribuidas, incluyendo áreas hipotalámicas y extrahipotalámicas de regulación endocrina. La zona externa de la eminencia media es particularmente rica en inervación encefalinérgica, procedente de los núcleos paraventricular y arqueado del hipotálamo (Höllt 1986, Udenfriend y Kilpatrick 1984, Watson y col. 1984).

La prodinorfina contiene secuencias para la [Leu]-encefalina, la dinorfina B (dinorfina<sub>1-13</sub>), las  $\alpha$  y  $\beta$ -neoendorfinas y la dinorfina A (dinorfina<sub>1-17</sub>), que a su vez contiene la secuencia de la dinorfina<sub>1-8</sub> (Esquema 1, Tabla 1). En la hipófisis, las mayores cantidades de dinorfina se encuentran en el lóbulo neural, siendo escasa su localización en el lóbulo intermedio y nula en el lóbulo anterior. En el encéfalo, las células dinorfinérgicas se encuentran en diversos núcleos del hipotálamo, sistema límbico y mesencéfalo, todas ellas regiones relevantes en el control endocrino. Existe una ruta que contiene péptidos relacionados con la dinorfina que se proyecta desde el núcleo paraventricular a la eminencia media externa y al lóbulo neural de la hipófisis (Goldstein 1984, Höllt 1986, Watson y col. 1984).

Tanto los opiáceos como los opioides y los péptidos opioides endógenos, han ayudado sustancialmente a la identificación de los receptores opioides. Goldstein y sus

PRECURSOR	PÉPTIDO	ESTRUCTURA
POMC Humano (267aa)	$\beta$ -endorfina	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu.</b>
	$\gamma$ -endorfina	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu.</b>
	$\alpha$ -endorfina	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr.</b>
Proencefalina (A) Humano (269aa)	[Met]-encefalina	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Met</b>
	[Leu]-encefalina	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu</b>
	[Met]-encefalina-Arg-Phe	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe</b>
	[Met]-encefalina Arg-Gly-Leu	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Gly-Leu</b>
	Péptido E	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-Arg-Ser-Gln-Gln-Asp-Pro-Asn-Ala-Tyr-Tyr-Glu-Glu-Leu-Phe-Asp-Val.</b>
Prodinorfina (Proencefalina B)	$\alpha$ -neo-endorfina	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys</b>
	$\beta$ -neo-endorfina	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro</b>
Cerdo (256aa)	Dinorfina A (1-17)	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln.</b>
	Dinorfina A (1-8)	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile</b>
	Leumorfina (dinorfina B(1-29))	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-Arg-Ser-Gln-Gln-Asp-Pro-Asn-Ala-Tyr-Tyr-Glu-Glu-Leu-Phe-Asp-Val.</b>
	Dinorfina B (rimorfina)	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr</b>

Tabla 1. Precursores opioides y sus productos de mayor actividad opioide (tomado de Kelly, 1996).



MSH, hormona estimulante de melanocitos; ACTH, adrenocorticotropina; LPH, lipotropina; END, endorfina; OP, octapéptido; HP, heptapéptido; EN, neoendorfina; DIN, dinorfina.

Esquema 1. Representación esquemática de las moléculas precursoras de los péptidos opioides, señalando los productos finales que se obtienen después del procesamiento del correspondiente precursor (tomado de Kelly, 1996, citando a Millan, 1986).

colaboradores (1971) propusieron la utilización de compuestos marcados radiactivamente para demostrar la existencia de estos receptores y caracterizarlos. Tan pronto como se dispuso de radioligandos con alta actividad específica, tres grupos diferentes, independientemente pero simultáneamente, demostraron la existencia de sitios de unión opioide estereoespecíficos en cerebro de mamíferos (Pert y Snyder 1973, Simon y col. 1973, Terenius 1973). Por otra parte, aunque a mediados de los años 60 se empezaba a pensar en la existencia de distintos tipos de receptores opioides, ya que así se explicaban mejor las acciones producidas por agonistas, antagonistas y agonistas-antagonistas mixtos opioides (Portoghese 1965), la primera evidencia convincente de este concepto fue proporcionada por Martin y sus colaboradores en 1976. Sus observaciones comportamentales y neurofisiológicas, en perros crónicamente espinalizados, les llevaron a proponer la existencia de tres tipos de receptores opioides, a los que denominaron Mu ( $\mu$ ), Kappa ( $\kappa$ ) y Sigma ( $\sigma$ ). Tras el descubrimiento de las encefalinas, Kosterlitz y sus colaboradores (Hughes y col. 1975) estudiaron sus propiedades y las de otros opioides mediante técnicas de unión de radioligandos y bioensayos con tejidos periféricos. De hecho, no sólo existen receptores opioides en el sistema nervioso central (SNC), sino que también existen en la periferia, lo que ha sido aprovechado para proporcionar modelos funcionales de acción opioide. Así, durante más de 30 años se han utilizado preparaciones de *ileum* de cobaya y conducto deferente de ratón, rata, conejo y hámster en multitud de ensayos farmacológicos, con el objetivo de valorar las propiedades agonistas/antagonistas de los opioides (Kosterlitz y col. 1980, Wild y col. 1993). Estos autores encontraron que mientras que la morfina se revelaba más potente que las encefalinas, en cuanto a la inhibición de la liberación de neurotransmisor evocada eléctricamente en el *ileum* de cobaya, en la preparación de conducto deferente de ratón ocurría lo contrario. Basados en éstas y otras observaciones, Kosterlitz y sus colaboradores propusieron la existencia de un cuarto tipo de receptor opioide, presente en el conducto deferente de ratón, al que denominaron receptor

delta ( $\delta$ ) (Lord y col. 1977). Como posteriormente se demostró la naturaleza no opioide del receptor sigma (Mannalack y col. 1986), en la actualidad los receptores opioides suelen clasificarse en tres tipos principales, definidos farmacológicamente:  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ . Su existencia ha sido claramente confirmada recientemente gracias a las técnicas de biología molecular, mediante las que se han conseguido clonar los tres tipos de receptores opioides descritos (Reisine y Bell 1993, Kieffer 1995, Satoh y Minami 1995). Algunos estudios sugieren la existencia de otros tipos de receptores opioides, como el receptor epsilon ( $\epsilon$ ) (Wüster y col. 1979), el receptor zeta ( $\zeta$ ) (Zagon y col. 1991) y el receptor lambda ( $\lambda$ ) (Grevel y col. 1985). El receptor  $\epsilon$  es el que se ha estudiado con mayor detalle, principalmente en el conducto deferente de ratón y de estos estudios se deduce que este receptor presenta propiedades farmacológicas marcadamente diferentes a las de los receptores opioides descritos (Schulz y col. 1981, Shook y col. 1988), sin embargo algunos autores sugieren que podría corresponder a un subtipo del receptor  $\mu$  o  $\kappa$  (Fowler y Fraser 1994, Nock y col. 1993). El receptor  $\zeta$  muestra gran afinidad por la [Met]-encefalina en el interior del núcleo de células en desarrollo. Actualmente se sugiere que la [Met]-encefalina, al unirse al receptor  $\zeta$ , podría actuar como un factor de crecimiento opioide tónicamente activo, cuya función sería la de inhibir el crecimiento y la proliferación celular (Isayama y col. 1995, Zagon y McLaughlin 1992, Zagon y col. 1995). De cualquier forma, todos estos receptores no están aún bien caracterizados y la aceptación de su existencia requiere evidencias experimentales adicionales, en particular el aislamiento de sus ADN<sub>c</sub>. También se ha encontrado un receptor de gran similitud estructural con los receptores opioides clásicos, al que se ha denominado ORL<sub>1</sub>, cuyo ligando endógeno se ha denominado orfanina o nociceptina (Henderson y McKnight 1997, Meunier y col. 1995, Reinscheid y col. 1995). Sin embargo, se ha visto que este péptido deriva de un precursor diferente a los precursores de los péptidos opioides (Meunier y col. 1995) y en los aspectos farmacológicos difiere bastante de ellos (Zhang y Yu 1995).

De diversos estudios se deduce que los distintos ligandos endógenos interaccionan preferencialmente con determinados subtipos de receptores opioides (Tabla 2). En líneas generales, los péptidos opioides derivados de la proencefalina muestran selectividad por los receptores  $\delta$ , mientras que los derivados de la prodinorfina presentan afinidad por los receptores  $\kappa$  (Corbett y col. 1982, Chavkin y col. 1982). No existe, sin embargo, una fuerte correlación entre los opioides derivados de la proopiomelanocortina y los receptores  $\mu$ , ya que mientras unos autores encuentran una selectividad mayor de la  $\beta$  endorfina por los receptores  $\mu$ , otros estudios revelan que este compuesto posee la misma selectividad por los receptores  $\mu$  que por los  $\delta$  (Tabla 2).

#### I.1.1.2. Receptores opioides: ligandos, subtipos, distribución y funciones.

##### Receptores opioides delta ( $\delta$ ).

##### *Agonistas de los receptores opioides $\delta$ .*

La mayoría de los agonistas  $\delta$  son péptidos derivados de las encefalinas o pertenecen a los opioides derivados de la piel de anfibios. El D-Ala<sup>2</sup>-D-Leu<sup>5</sup>-encefalina (DADLE) se comporta como agonista selectivo  $\delta$  en ensayos con *ileum* de cobaya y conducto deferente de ratón (Kosterlitz y col. 1980), sin embargo estudios posteriores han demostrado que este compuesto únicamente presenta el doble de afinidad por los receptores  $\delta$  que por los  $\mu$  (James y Goldstein 1984). Entre los compuestos más selectivos del receptor  $\delta$  se encuentran el hexapéptido DSLET que posee una selectividad 20 a 600 veces mayor, dependiendo del ensayo, por este tipo de receptores que por los  $\kappa$  y  $\mu$  (Gacel y col. 1980), y compuestos como el DTLET, DSTBULET, BUBU, BUBUC, DPLPE, DPDPE etc... Los péptidos opioides obtenidos de la piel de anfibios, como la deltorfina (o deltorfina A), deltorfina I (o deltorfina C) y la deltorfina II (o deltorfina B) (Erspamer y col. 1989, Lazarus y col. 1994), presentan una afinidad y selectividad por los receptores  $\delta$  mayor que la que poseen los análogos sintéticos de las encefalinas (Erspamer y col. 1989).

LIGANDO ENDÓGENO	SELECTIVIDAD	REFERENCIA
$\beta$ -Endorfina	$\mu=\delta$	(Lord y col. 1977)
	$\mu>\delta$	(McKnight y col. 1983)
<b>Encefalinas</b>		
[Met]-Encefalina	$\delta>\mu$	(McKnight y col. 1983)
	$\delta>>\mu$	(Lord y col. 1977)
[Met]-Encefalina-Arg <sup>6</sup> -Phe <sup>7</sup>	$\delta>\mu$	(McKnight y col. 1983)
	$\delta>\mu$	(Wüster y col. 1981)
[Leu]-Encefalina	$\delta>\mu$	(Lord y col. 1977)
	$\delta>\mu$	(McKnight y col. 1983)
	$\delta\geq\mu\geq\kappa$	(Quiron 1984)
<b>Dinorfinas</b>		
Dinorfina A <sub>1-17</sub>	$\kappa>\mu\delta$	(Corbett y col. 1982)
Dinorfina A <sub>1-8</sub>	$\kappa>\mu>\delta$	(Corbett y col. 1982)
	$\kappa>\mu$	(James y col. 1984).
Dinorfina B <sub>1-29</sub>	$\kappa>>\mu$	(James y col. 1984).
Dinorfina B <sub>1-13</sub>	$\kappa>\delta>\mu$	(Wüster y col. 1981)
	$\kappa>\mu>\delta$	(Chavkin y col. 1982)
	$\kappa>\mu\delta$	(Corbett y col. 1982)
$\alpha$ -Neoendorfina	$\kappa>\mu$	(James y col. 1984)

Tabla 2. Selectividad de los distintos opioides endógenos por los subtipos de receptores opioides (tomado de Kelly 1996).

Recientemente se han sintetizado agonistas no peptídicos como el SNC 80, compuesto que presenta propiedades prometedoras dada su alta selectividad y su mínima toxicidad.

#### *Antagonistas de los receptores opioides $\delta$ .*

Los primeros antagonistas que presentaban una selectividad significativa por el receptor  $\delta$  fueron análogos de las encefalinas. El ICI 154,129 presenta alta selectividad por este tipo de receptor pero es poco potente (Shaw y col. 1982). Por otro lado el ICI 174,864 es muy potente (Cotton y col. 1984) pero su degradación por carboxipeptidasas produce un agonista  $\mu$ , lo que resulta problemático especialmente en investigaciones *in vivo* destinadas a inactivar específicamente los receptores  $\delta$  (Cohen y col. 1986). El naltrindol (NTI) fue el primer antagonista  $\delta$  realmente selectivo y potente que se sintetizó (Portoghese y col. 1988). Se une a receptores  $\delta$  de membranas cerebrales de mono con valores de  $K_i$  en el rango picomolar y tiene una selectividad 100 veces mayor por los receptores  $\delta$  que por los  $\mu$  o  $\kappa$  (Emmerson y col. 1994). Este antagonista, por las propiedades mencionadas y su naturaleza no peptídica (atravesada barrera hematoencefálica) constituye una herramienta importante en la investigación con opioides, y ha sido el compuesto elegido para bloquear los receptores  $\delta$  en esta Tesis Doctoral. En ratón, el naltrindol también actúa como agonista del receptor  $\kappa$ , pero a dosis mucho más altas que las que bloquean los receptores  $\delta$  (Stapelfeld y col. 1992, Takemori y col. 1992). Otro antagonista  $\delta$  altamente selectivo y potente es el TIPP (Schiller y col. 1992).

#### *Subtipos de receptores opioides $\delta$ .*

Se ha sugerido la existencia de distintos subtipos de receptores opioides  $\delta$ , dado que se ha observado un bloqueo diferencial de la acción producida por agonistas de estos receptores, tras la administración de diferentes antagonistas selectivos  $\delta$  (Jiang y col. 1991, Sofuoglu y col. 1991). Estudios farmacológicos realizados *in vivo* llevaron a proponer la

existencia de dos sitios de reconocimiento  $\delta$ :  $\delta_1$  y  $\delta_2$  (Fang y col. 1994, Fowler y Fraser 1994). De estudios *in vivo* en roedores se deduce que uno de los subtipos es estimulado por el DPDPE ( $\delta_1$ ), cuyos efectos antinociceptivos son antagonizados selectivamente por BNTX o por DALCE (Jiang y col. 1991, Sofuoglu y col. 1993), mientras que el otro subtipo ( $\delta_2$ ) es estimulado por la deltorfina II y el DSLET, cuyas acciones antinociceptivas son revertidas por NTB ó 5'-NTII (Jiang y col. 1991, Sofuoglu y col. 1991, Sofuoglu y col. 1993). También se ha observado que la antinocicepción inducida por agonistas  $\delta_1$  o  $\delta_2$  *in vivo*, puede ser antagonizada diferencialmente mediante el bloqueo de diferentes tipos de canales de potasio (Wild y col. 1991). Los resultados obtenidos de experimentos realizados *in vitro* que más apoyan la existencia de estos dos subtipos de receptores  $\delta$ , derivan de estudios de inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa en membranas cerebrales de rata (Buzas y col. 1994, Noble y Cox 1995) y de estudios de la elevación, mediada por receptores  $\delta$ , del calcio intracelular en la línea celular ND8-47. En estos estudios, se ha encontrado que la BNTX antagonizó selectivamente el DPDPE y el NTB antagonizó selectivamente la deltorfina II (Tang y col. 1994).

Por otra parte, los receptores  $\delta$  también han sido clasificados en  $\delta_{cx}$ ,  $\delta_{cxi}$ , subdivisión basada en la hipótesis de que un subtipo de receptor  $\delta$  se encuentra formando un complejo-receptor con el receptor  $\mu$  (y quizás también con el  $\kappa$ ) ( $\delta_{cx}$ ) mientras que el otro subtipo de receptor ( $\delta_{ncx}$ ) no se encontraría formando dicho complejo (Rothman y col. 1993).

Así, dado que existen dos clasificaciones diferentes de los subtipos de receptores  $\delta$ , es preciso conocer la relación entre los receptores  $\delta_{cx}$ ,  $\delta_{ncx}$  y los  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ . El hecho de que el antagonista DALCE inhibiera selectivamente el *binding* sobre los receptores  $\delta_{ncx}$  (Rothman y col. 1992) y bloqueara el efecto del agonista DPDPE sobre el receptor  $\delta_{ncx}$  (Jiang y col. 1990c) sugiere que los receptores  $\delta_1$  se corresponden con los  $\delta_{ncx}$ . Los receptores  $\delta_2$ , como ya hemos comentado, son activados selectivamente por la deltorfina II, y bloqueados selectivamente por el antagonista irreversible  $\delta$  5'-NTII (Jiang y col. 1991). Pues bien, dosis

de 5'NTII que bloquean los efectos de la deltorfina II, también bloquearon la modulación que ejercieron ligandos  $\delta$  sobre la antinocicepción inducida por morfina (Porreca y col. 1992, Rothman y col. 1993) y se pensó entonces que los efectos fueron mediados por los receptores  $\delta_{cx}$  (Holaday y col. 1990, Rothman y col. 1993). Estos resultados, por tanto, sugieren que los receptores  $\delta_2$  se corresponden con los  $\delta_{cx}$ . Sin embargo existe controversia ya que otros estudios sugieren que son los  $\delta_1$  los que se corresponden con los  $\delta_{cx}$  (Suzuki y col. 1995).

La demostración de la existencia de estos subtipos de receptores requiere investigaciones adicionales ya que, hasta la fecha, únicamente se ha clonado una proteína con el perfil farmacológico típico de receptor opioide  $\delta$ .

#### *Distribución de los receptores opioides $\delta$ .*

Estos receptores presentan una distribución en el SNC más restringida que otros tipos de receptores opioides. Las mayores densidades se encuentran en el bulbo olfatorio, neocortex, caudado putamen y núcleo accumbens mientras que el tálamo, hipotálamo y tronco cerebral son áreas cerebrales relativamente pobres en estos receptores (Dupin y col. 1991, Mansour y col. 1987, 1988, Renda y col. 1993).

#### *Funciones de los receptores opioides $\delta$ .*

Los receptores  $\delta$  se encuentran implicados en numerosas funciones entre las que se encuentran la modulación del dolor, integración motora, motilidad gastrointestinal, olfato, respiración, funciones cognitivas etc... En ratas se ha visto que las encefalinas endógenas, así como los agonistas selectivos  $\delta$ , incrementan la actividad motora e inducen efectos de tipo antidepresivo (Baamonde y col. 1992). Se sabe los receptores  $\delta$  espinales están implicados notablemente en la mediación de los efectos antinociceptivos producidos por agonistas  $\delta$  (Drower y col. 1991, Improta y Broccardo 1992, Porreca y col. 1984, 1987a,

Stewart y Hammond 1993, Sullivan y col. 1989), ya que se ha observado que estos agonistas inhiben la liberación de sustancia P y péptido relacionado con el gen de la calcitonina, desde los terminales de las fibras aferentes nociceptivas primarias del asta dorsal de la médula espinal de rata (Bourgoin y col. 1994). La administración de agonistas  $\delta$  en médula espinal parece ser particularmente efectiva en la producción de antinocicepción frente a estímulos térmicos y químicos (Paul y col. 1989, Porreca y col. 1987a, Schmauss y Yaksh 1984). Sin embargo, no se excluye la participación de receptores  $\delta$  supraespinales y periféricos en la modulación del dolor (Stein 1993). De hecho algunos autores han aportado evidencias de la participación de receptores supraespinales en la analgesia producida por agonistas  $\delta$  (Heyman y col. 1988, Jiang y col. 1990a, Mathiasen y Vaught 1987). El tratamiento con agonistas  $\delta$  puede reducir la frecuencia respiratoria y prolongar el tiempo de espiración (Haddad y col. 1984, Morin-Surun y col. 1984). Por otro lado, tanto los receptores periféricos (Fox-Threlkeld y col. 1994) como los centrales (espinales y supraespinales) (Broccardo e Improta 1992, Burks y col. 1988, Pol y col. 1994) participan en la inhibición del tránsito gastrointestinal producido por agonistas  $\delta$ .

### Receptores opioides kappa ( $\kappa$ ).

#### *Agonistas de los receptores opioides $\kappa$ .*

Para el estudio de estos receptores se utilizaron inicialmente compuestos como la ketociclazocina, etilketociclazocina (Lord y col. 1977, Martin y col. 1976), bremazocina (Römer y col. 1980) y tifluadom (Römer y col. 1982) que tienen alta afinidad por los receptores opioides pero son poco selectivos (Emmerson y col. 1994). En 1982 se sintetizó el primer agonista  $\kappa$  que resultó realmente selectivo, el U-50,488 (Lahti y col. 1982, Von Voigtlander y col. 1983). Le siguieron compuestos como el U-69,593 (Lahti y col. 1985) y el U-62,066 (Von Voigtlander y Lewis 1988) de comparable (Emmerson y col. 1994, France y col. 1994) o mayor (Lahti y col. 1985) selectividad. Otros agonistas  $\kappa$  sintetizados son el PD

117302 (Clark y col. 1988), ICI 197067 y CI-977 (o PD 129290 o enadolina) (Hunter y col. 1990), compuesto de gran afinidad y selectividad, que hemos utilizado en esta Tesis Doctoral.

#### *Antagonistas de los receptores opioides $\kappa$ .*

Entre los antagonistas del receptor  $\kappa$  se encuentran el TENA, compuesto poco selectivo (Kosterlitz y col. 1981, Portoghese y Takemori 1985) y la norbinaltorfimina (nor-BNI) (Portoghese y col. 1987) cuya selectividad ha sido cuestionada por algunos autores (Birch y col. 1987, Levine y col. 1990, Spanagel y col. 1994) y que *in vivo* exhibe una actividad de larga duración (Horan y col. 1992). Se han sintetizado compuestos más potentes y selectivos que la nor-BNI, como el 5' -[N<sup>2</sup>-(butilamidino)-metil] NTI (Olmsted y col. 1993). El UPHIT y el DIPPA, derivados del U-50-488, se comportan como antagonistas selectivos e irreversibles de estos receptores (De Costa y col. 1989, Chang y col. 1994).

#### *Subtipos de receptores opioides $\kappa$ .*

Se ha propuesto la existencia de tres subtipos de receptores  $\kappa$ :  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  y  $\kappa_3$ . El U-50,488, U-69,593 y CI-977 se unirían únicamente al subtipo  $\kappa_1$ , mientras que otros agonistas  $\kappa$  también interaccionarían con los subtipos  $\kappa_2$  y  $\kappa_3$  (Clark y col. 1989, Horan y col. 1991, 1993, Nock y col. 1990). Por el momento no está claramente definido el perfil farmacológico de los sitios de unión  $\kappa_2$  y  $\kappa_3$ . Algunos autores propusieron que podrían corresponder a receptores  $\epsilon$  y/o  $\mu_2$  (Fowler y Fraser 1994, Nock y col. 1990, 1993). Además en cerebro de ratón y cobaya se ha descrito la posible existencia de subtipos  $\kappa_{2a}$  y  $\kappa_{2b}$  (Rothman y col. 1990). También se ha postulado la existencia de subdivisiones  $\kappa_{2a-1}$ ,  $\kappa_{2a-2}$ ,  $\kappa_{2b-1}$  y  $\kappa_{2b-2}$  en tejido cerebral de cobaya en función de la alta o baja afinidad por diversos agonistas (Ni y col. 1995). La ausencia de antagonistas específicos para los distintos subtipos de este receptor, dificulta una clasificación precisa y su completa caracterización, aunque parece ser que, al

menos en ratón, la subdivisión  $\kappa_1/\kappa_2$  se justifica a través de los antagonistas (-)-UPHIT y WIN 44,441 respectivamente (Horan y col. 1991, 1993). Por otra parte, los denominados subtipos de receptor  $\kappa$  (y de otros receptores opioides) podrían corresponder a diferentes estados de afinidad de un mismo receptor, dependiendo de su acoplamiento con la proteína G (Richardson y col. 1992).

#### *Distribución de los receptores opioides $\kappa$ .*

Las áreas cerebrales que presentan una mayor densidad de receptores  $\kappa$  en la rata son el núcleo accumbens, claustró, núcleo dorsal endopiriforme y núcleo interpeduncular (Boyle y col. 1990, Nock y col. 1988), sin embargo se ha encontrado poco *binding* en la corteza cerebral.

#### *Funciones de los receptores opioides $\kappa$ .*

Estos receptores están implicados en la regulación de diversas funciones como son la nocicepción, diuresis, alimentación y secreción neuroendocrina (Hansen y Morgan 1984). Además, estudios recientes que demuestran la expresión de receptores  $\kappa$  por las células de linfoma (Hom y col. 1995), sugieren que estos receptores también participan en el control de la función inmune. Los agonistas  $\kappa$  tienen propiedades antinociceptivas (France y col. 1994, Millan 1989, Millan y col. 1989, Nakazawa y col. 1991, Porreca y col. 1987a, Schmauss 1987), sin embargo se han publicado datos contradictorios respecto a la naturaleza de los estímulos nociceptivos frente a los que son particularmente efectivos (Millan 1989, Porreca y col. 1987a, Schmauss 1987). Parece claro que los agonistas  $\kappa$  producen sus efectos analgésicos mediante la actuación sobre receptores espinales, sin embargo todavía existen desacuerdos respecto a la existencia de sitios de unión supraespinales, que pueden estar involucrados en estos efectos (Millan y col. 1989, Nakazawa y col. 1991, Porreca y col. 1987a, Schmauss 1987).

## Receptores opioides Mu ( $\mu$ ).

### *Agonistas de los receptores opioides $\mu$ .*

El conocimiento de las propiedades farmacológicas de los receptores  $\mu$  deriva, en gran parte, de los numerosos estudios realizados en *ileum* de cobaya, tejido rico en este tipo de receptores opioides. Se sabe que la morfina tiene aproximadamente una afinidad 50 veces mayor por los receptores  $\mu$  que por los  $\delta$  (Emmerson y col. 1994). En distintos estudios se observó que este agonista prototipo tenía preferencia por los receptores  $\mu$ , pero también se unía con baja afinidad a los receptores  $\delta$  y  $\kappa$  (Corbett y col. 1993, Matthes y col. 1998, Raynor y col. 1994). Esta diferente selectividad podría ser suficiente para examinar las respuestas de los receptores  $\mu$  *in vitro*, pero no aseguraba la selectividad  $\mu$  en experimentos *in vivo*. Así, durante mucho tiempo se ha creído que la morfina activa múltiples receptores *in vivo*. La investigación de las respuestas a morfina en ratones en los que se ha eliminado el gen que codifica para el receptor  $\mu$  (*knockout*  $\mu$ ), han clarificado el modo de acción de la morfina. La completa pérdida de actividad biológica de la morfina en estos animales, demuestra que tanto los efectos terapéuticos como los adversos de la morfina resultan de su interacción con un único producto génico (Gavériaux-Ruff y col. 1998, Loh y col. 1998, Matthes y col. 1996, 1998, Roy y col. 1998, Schuller y col. 1997, Sora y col. 1997b, Tian y col. 1997). Asimismo se ha encontrado que la analgesia inducida por morfina es preservada en ratones *Knockout* para el receptor  $\delta$  (Zhu y col. 1997) o  $\kappa$  (Simonin y col. 1998). Otros agonistas no peptídicos son el sufentanil, agonista potente con alta afinidad y selectividad por los receptores  $\mu$  (Emmerson y col. 1994, Magnan y col. 1982) y el alfentanil que también posee alta afinidad por estos receptores y que ha sido utilizado en esta Tesis Doctoral. Otro agonista muy selectivo y potente de estos receptores es el etonitazeno (Emmerson y col. 1994). Entre los agonistas selectivos  $\mu$  más utilizados se encuentra un análogo de las encefalinas, el DAMGO, también llamado DAGO o DAGOL (Handa y col. 1981), que posee alta afinidad por estos receptores. Por otra parte las

dermorfinas, heptapéptidos naturales, también son compuestos con alta afinidad y selectividad por los receptores  $\mu$  (Negri y col. 1992, Richter y col. 1990).

#### *Antagonistas de los receptores opioides $\mu$ .*

La naloxona, el primer antagonista opioide identificado, tiene mayor afinidad por los receptores  $\mu$  que por el resto de receptores opioides (Emmerson y col. 1994, Magnan y col. 1982). Así, una cuidadosa selección de la dosis puede conducir al bloqueo completo de los receptores  $\mu$  con un mínimo antagonismo sobre los receptores  $\delta$  y  $\kappa$ . La acción es inmediata porque atraviesa muy bien la barrera hematoencefálica (Zimmerman y Leander 1990). La naltrexona es menos selectiva por el receptor  $\mu$  (Emmerson y col. 1994, Magnan y col. 1982) pero es más potente y tiene un tiempo de actuación mayor que la naloxona (Crabtree 1984). La  $\beta$ -funaltrexamina ( $\beta$ -FNA) (Portoghese y col. 1980) actúa como antagonista irreversible de los receptores  $\mu$ , pero también como agonista reversible de los receptores  $\kappa$  (Ward y col. 1985). Recientemente se han sintetizado compuestos como el N-CPM-MET-CAMO, y MET-CAMO, que son antagonistas selectivos irreversibles de los receptores  $\mu$  y no ejercen acciones agonistas sobre otros receptores opioides (Jiang y col. 1994). Otros antagonistas con alta selectividad por los receptores  $\mu$  son péptidos cíclicos relacionados con la somatostatina (Kazmierski y col. 1988, Pelton y col. 1986) como el CTAP y el CTOP, que son utilizados frecuentemente.

#### *Subtipos de receptores opioides $\mu$ .*

Se ha sugerido la existencia de dos subtipos de receptores  $\mu$ , denominados  $\mu_1$  y  $\mu_2$ . Pasternak y sus colaboradores (Pasternak y Wood 1986) proponen que el subtipo  $\mu_2$  correspondería al receptor  $\mu$  que han definido los estudios farmacológicos en el *ileum* de cobaya, mientras que el subtipo  $\mu_1$  poseería un perfil farmacológico distinto. En particular, este último subtipo podría exhibir una afinidad 5 veces mayor por DAMGO que el subtipo  $\mu_2$ .

El meptazinol y el etonitazeno serían agonistas  $\mu_1$  preferenciales, y la naloxazona y naloxonazina serían antagonistas  $\mu_1$  (Pasternak y Wood 1986). Sin embargo, como ocurre con los otros tipos de receptores opioides, aún no se han obtenido resultados de los estudios de biología molecular, que apoyen la existencia de subtipos de receptores  $\mu$ . Investigaciones recientes sugieren la existencia de un nuevo subtipo de receptor  $\mu$ , sobre el que actuarían análogos de la morfina con sustituciones en la posición 6 (morfina- 6 $\beta$ -glucuronizada, heroína y 6-acetil-morfina) (Rossi y col. 1996). Apoyaría esta hipótesis el hecho de que en *test* nociceptivos realizados en ratón, se ha visto que la morfina no presenta tolerancia cruzada con la morfina- 6 $\beta$  -glucuronizada, heroína y 6-acetil-morfina y que en la cepa de ratón CXBX, la morfina apenas produce antinocicepción mientras que los análogos de la morfina con sustituciones en la posición 6 son agentes antinociceptivos potentes.

#### *Distribución de los receptores opioides $\mu$ .*

Los estudios autorradiográficos realizados con radioligandos selectivos muestran que los receptores  $\mu$  están distribuidos a través de todo el neuroeje. La mayor densidad de receptores  $\mu$  se encuentra en el caudado putamen y va disminuyendo en el orden siguiente: neocortex, tálamo, núcleo accumbens, hipocampo y amígdala. Los receptores  $\mu$  también están presentes en las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal, donde están localizados, al menos en parte, en los terminales presinápticos de las fibras aferentes primarias nociceptivas (Besse y col. 1990). Existe una concentración moderada de estos receptores en la sustancia gris periacueductal y núcleo del rafe y hay baja densidad en el hipotálamo, área preóptica, y globo pálido (Hawkins y col. 1988, Mansour y col. 1988, Waksman y col. 1986). Los receptores  $\mu$  también se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso periférico. En particular, estos receptores se expresan en las neuronas mientéricas en el intestino (Hutchison y col. 1975) y en el conducto deferente de

rata (Lemaire y col. 1978).

#### *Funciones de los receptores opioides $\mu$ .*

Los agonistas selectivos  $\mu$  bloquean las respuestas nociceptivas a estímulos mecánicos, térmicos y químicos de alta intensidad (Knapp y col. 1989), son por tanto drogas antinociceptivas potentes. Tanto los receptores  $\mu$  espinales y supraespinales como los localizados en la periferia juegan un papel importante en el control de la nocicepción (Chaillet y col. 1984, Fang y col. 1986, Hansen y Morgan 1984, Paul y col. 1989, Porreca y col. 1984, 1987a, Stein 1993). Estos receptores controlan además la función respiratoria, cardiovascular e inmune, el tránsito intestinal, la termorregulación y la secreción hormonal, funciones que, excepto esta última, son deprimidas, la mayor parte de las veces, por la estimulación de los receptores  $\mu$ . Los efectos depresores de la respiración y los efectos cardiovasculares están mediados por receptores centrales y por receptores localizados periféricamente. Los agonistas  $\mu$ , dependiendo de las especies animales y la temperatura ambiental, pueden producir hipotermia o hipertermia (Adler y Geller 1988, Handler y col. 1994). De forma similar, los efectos sobre la actividad locomotora dependen también de la especie animal y la dosis de agonista administrada (Bot y col. 1992, Meyer y Meyer 1993ab). Los distintos laboratorios que han generado ratones *Knockout* para el receptor  $\mu$  (Loh y col. 1998, Matthes y col. 1996, Schuller y col. 1997, Sora y col. 1997b, Tian y col. 1997) han comprobado, mediante la administración de morfina, la implicación de los receptores  $\mu$  en la antinocicepción, depresión respiratoria, síndrome de abstinencia, inmunosupresión, actividad motora, constipación y recompensa (Gavériaux-Ruff y col. 1998, Loh y col. 1998, Matthes y col. 1996, 1998, Roy y col. 1998, Schuller y col. 1997, Sora y col. 1997b, Tian y col. 1997).

En la tabla 3 se presentan los principales agonistas y antagonistas de los receptores

opioides. La estructura molecular de los compuestos utilizados en esta Tesis Doctoral se muestran en la Figura 1.

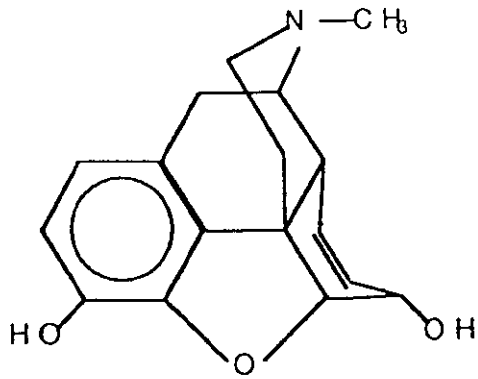
#### I.1.1.3. Biología molecular de los receptores opioides.

Los avances realizados en las técnicas de biología molecular han permitido clonar y caracterizar los genes que codifican las tres familias de péptidos opioides endógenos - proencefalina, prodinorfina y proopiomelanocortina- así como sus receptores-  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (Akil y col. 1984, Kieffer 1995, Knapp y col. 1995, Satoh y Minami 1995). Como ya hemos comentado, no existe apoyo de la investigación molecular para la existencia de subtipos de receptores opioides que han sido caracterizados farmacológicamente, ya que por el momento únicamente se han clonado tres genes homólogos. Así, podría pensarse que un *splicing* alternativo, modificaciones postraduccionales de los productos génicos (glicosilación, N-acetilación, palmitoilación, fosforilación etc...), interacciones de los receptores con distintas proteínas y efectores intracelulares, una distinta localización subcelular de los receptores etc... podrían ser mecanismos potencialmente responsables de la heterogeneidad farmacológica descrita (Befort y Kieffer 1997, Corbett y col. 1999, Dondio y col. 1997, Pan 1988, Zaki y col 1996). Otra posibilidad sería la existencia de otros genes que codifiquen para receptores opioides y que todavía no hayan sido aislados. Los ratones deficientes en receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  constituyen una herramienta importante en la investigación de esta hipótesis (Kieffer 1999).

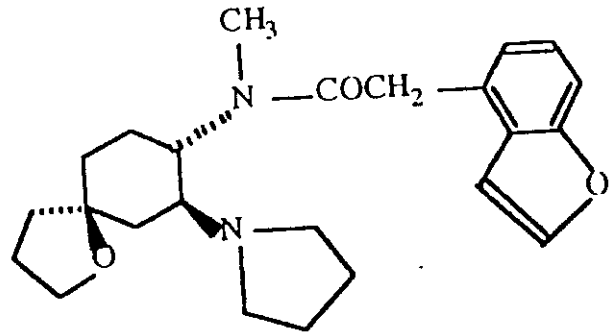
Como hemos comentado, en la actualidad se han clonado los tres tipos de receptores opioides descritos. Dos grupos independientes clonaron el primer receptor opioide - el receptor  $\delta$  de ratón- utilizando métodos similares (Evans y col. 1992, Kieffer y col. 1992). Tanto este receptor como el receptor  $\delta$  de rata, que fue clonado posteriormente (Fukuda y col. 1993), son proteínas de 372 aminoácidos que poseen un 97% de similitud. También ha sido clonado el receptor  $\delta$  humano que posee el mismo número de aminoácidos

<b>RECEPTOR</b>	<b>AGONISTAS</b>	<b>ANTAGONISTAS</b>
$\delta$	DADLE DSLET DTLET DSTBULET BUBU BUBUC DPLPE DPDPE Deltorfina Deltorfina I Deltorfina II <b>BW 373U86</b> <b>SNC 80</b> <b>SIOM</b>	ICI 154,129 ICI 174,864 TIPP TIPP ( $\psi$ ) DALCE <b>Naltrindol (NTI)</b> <b>BNTX</b> <b>Naltrindol 5' isotiocianato (5'-NTII)</b> <b>Naltriben</b> <b>N-bencilnaltrindol (BNTI)</b>
$\mu$	CDRI 82-205 DAMGO FK 33-824 PL 017 Demorfina Morficeptina TRIMU-5 <b>Sufentanil</b> <b>Morfina</b> <b>Etonitazeno</b> <b>Meptazinol</b> <b>Alfentanil</b>	CTOP CTP SMS-201,995 CTAP TCTOP (D-Tic-CTOP) <b>Naloxonacina</b> <b><math>\beta</math>-funaltrexamina (<math>\beta</math>-FNA)</b> <b>N-CPM-MET-CAMO</b> <b>MET-CAMO</b>
$\kappa$	[D-Pro <sup>10</sup> ]-Dyn (1-11) E-2078 Dinorfina Ia Ketociclazocina Etilketociclazocina Bremazocina Tifluadom <b>U-50,488</b> <b>U 69,593</b> <b>U-62,066 (espiradolina)</b> PD 117302 <b>CI-977 (PD 129290, enadolina)</b> ICI 197067 ICI 199441 ICI 204448 EMD 61753 EMD 60400 GR 89696	<b>TENA</b> <b>Nor-binaltrofimina (NorBNI)</b> <b>5'-[N<sup>2</sup>-(butilamidino)-metil]naltrindol</b> <b>UPHIT</b> <b>DIPPA</b>
No Selectivos		<b>Naltrexona</b> <b>Naloxona</b>

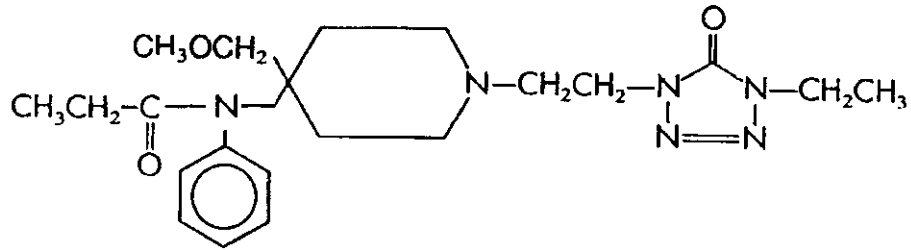
Tabla 3. Principales agonistas y antagonistas de los receptores opioides. Se señalan en negrita los compuestos no peptídicos.



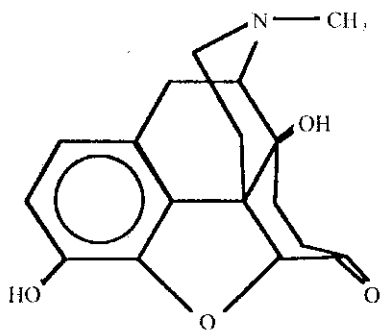
Morfina



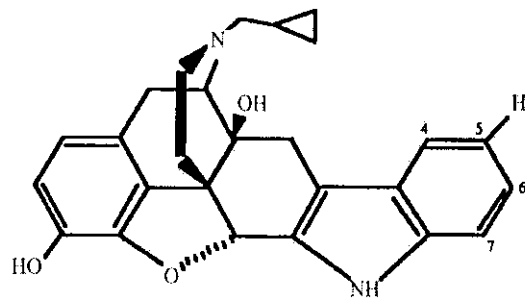
CI-977



Alfentanil



Naloxona



Naltrindol

Figura 1. Compuestos opioides utilizados en este trabajo.

y presenta una homología de un 93% con el receptor  $\delta$  de rata y ratón (Knapp y col. 1994). Mientras algunos autores proponen que el receptor clonado se corresponde con el  $\delta_{ncx}$  (Cha y col. 1995), otros sugieren que podría ser el subtipo  $\delta_2$  (Law y col. 1994).

Distintos grupos han aislado y caracterizado diversos clones de ADNc esencialmente idénticos, que codifican para el receptor  $\kappa$  de ratón (Yasuda y col. 1993), rata (Chen y col. 1993b, Li y col. 1993, Meng y col. 1993, Minami y col. 1993, Nishi y col. 1993) y cobaya (Xie y col. 1994). El receptor  $\kappa$  de ratón posee 380 aminoácidos y comparte un 61% de similitud con el receptor  $\delta$  de la misma especie. El receptor  $\kappa$  de rata y ratón tienen una similitud del 98% y éstos con el de cobaya presentan un 89% de homología. El receptor  $\kappa$  humano (Mansson y col. 1994) posee 380 aminoácidos y comparte una homología del 91% con el de rata. Sin embargo se ha observado poca homología con los receptores  $\delta$  (58%) y  $\mu$  (61%) humanos. El receptor clonado se sugiere que corresponde al caracterizado como subtipo  $\kappa_1$ , debido a la alta afinidad que presenta por el U-50,488 y U-69,593 (Lai y col. 1994, Meng y col. 1993, Raynor y col. 1994, Yasuda y col. 1993).

El receptor  $\mu$  ha sido clonado de la rata (Bunzow y col. 1993, Chen y col. 1993a, Fukuda y col. 1993, Minami y col. 1994, Thompson y col. 1993, Zastawny y col. 1994) y del hombre (Wang y col. 1993, 1994). El receptor  $\mu$  de rata consiste en una proteína de 398 aminoácidos, y tiene una similitud de un 64% con el receptor  $\delta$  de ratón. El receptor  $\mu$  humano posee 400 aminoácidos que forman una secuencia de un 95%, 59% y 62% de homología con los receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  de rata respectivamente.

Recientemente se ha clonado otra proteína (de 360-370 aminoácidos, dependiendo de las especies) denominada ORL<sub>1</sub> (de *Opioid Receptor Like protein*) porque posee un 50-60% de homología en su secuencia con los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ . Ha sido identificada en tres especies: rata, ratón y humano, con una homología entre las tres superior al 90% (Henderson y McKnight 1997). Para su agonista endógeno, un péptido aislado de tejidos cerebrales de diversas especies animales (rata, ratón, cobaya, bovino y humano), se

emplean dos nomenclaturas indistintamente y con igual frecuencia en la bibliografía: nociceptina (Meunier y col. 1995) y orfanina FQ (Reinscheid y col. 1995). Sin embargo se ha visto que este péptido deriva de un precursor diferente a los precursores de los péptidos opioides (Meunier y col. 1995). Así, aunque el receptor ORL<sub>1</sub> fue aceptado como miembro de la "familia" opioide por su similitud estructural con los receptores opioides clásicos, en los aspectos farmacológicos difiere bastante de ellos, ya que incluso los ligandos que exhiben una alta y uniforme afinidad por los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  muestran una muy baja afinidad por ORL<sub>1</sub>, de modo que únicamente se unen a este receptor las dinorfinas y con baja afinidad (Zhang y Yu 1995). El estudio comparativo de las secuencias aminoacídicas de los 4 receptores permitió detectar algunas diferencias estructurales clave para explicar las disimilitudes en el perfil farmacológico: en los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  en la parte superior de los segmentos transmembranales existen regiones muy conservadas que sin embargo están alteradas en ORL<sub>1</sub> y además se ha comprobado que la selectividad de ORL<sub>1</sub> por determinados agonistas se incrementa tras la sustitución de fragmentos pequeños (1-3 aminoácidos) de su secuencia por otros de alto grado de conservación presentes en la secuencia de  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (Meng y col. 1996).

Los estudios realizados han revelado que los receptores opioides son proteínas de membrana acopladas a proteína G con 7 hélices transmembranales, regiones en las que existe una homología del 73-76% entre los tres receptores. Los dominios intracelulares presentan un 63-66% de homología, mientras que la región extracelular muestra una similitud de sólo un 34-40%. Los principales sistemas efectores asociados a proteínas G identificados son la activación e inhibición de la adenilato ciclasa, la estimulación del *turnover* de foinositol y un acoplamiento directo de la proteína G con canales de K<sup>+</sup> o Ca<sup>+</sup> (Birnbaumer y col. 1990). Se han observado efectos opioides con todos estos sistemas efectores. La unión del ligando al receptor opioide conduce generalmente a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa que cataliza, en el lado citoplasmático de la membrana

plasmática, la síntesis de AMP cíclico a partir de ATP. Los tres tipos de receptores opioides pueden inhibir la formación de AMP cíclico. La activación de receptores  $\mu$  y  $\delta$  normalmente incrementa la conductancia del ion  $K^+$ , produciendo hiperpolarización neuronal e inhibición de la generación del potencial de acción. Por otra parte, la activación de receptores  $\kappa$  generalmente da como resultado una inhibición de la conductancia de  $Ca^+$ , lo que constituye un mecanismo de inhibición de la transmisión sináptica. Por tanto, el efecto global de la activación de los receptores opioides es la inhibición de la transmisión neural (Knapp y col. 1995).

### I.1.2. DESARROLLO ONTOGÉNICO DEL SOE.

El estudio ontogénico del SOE ha sido precedido por una gran cantidad de estudios en adultos. Esto ha sido debido a las dificultades que conlleva el estudio perinatal, referidas tanto a la aplicación de la metodología establecida para adultos en embriones y animales neonatos, como a las impuestas por el corto período de gestación, el pequeño tamaño del encéfalo de fetos y embriones, el rápido desarrollo postnatal y las diferencias en la maduración relativa entre distintas especies durante el período perinatal (McDowell y Kitchen 1987).

La mayoría de los estudios ontogénicos comenzaron en el SNC de rata. Así se confirmó que si bien todos los péptidos opioides endógenos están presentes en el SNC antes del nacimiento, el desarrollo del SOE no se completa hasta varias semanas después del nacimiento. Hacia la tercera semana postnatal se alcanzan los mayores niveles de opioides para casi todas las regiones cerebrales, salvo el cerebelo que los alcanza durante la primera semana postnatal (McDowell y Kitchen 1987). El desarrollo de los tres precursores opioides es independiente y los patrones ontogénicos y de distribución de sus distintos productos son, por tanto, distintos en el período postnatal. Estas diferencias

parecen ser reflejo, a su vez, de actividades diferenciales de procesamiento enzimático durante el desarrollo perinatal (ver para revisión McDowell y Kitchen 1987).

En cuanto a la ontogenia de los receptores opioides, se han realizado diversos estudios de unión de ligando a receptor. Las primeras técnicas empleadas se basaban en la utilización de homogenados de membrana de tejido encefálico y los primeros ligandos utilizados no eran selectivos, como la naloxona. El conocimiento sobre el desarrollo de los distintos tipos de receptores opioides se vio notablemente incrementado con la utilización de técnicas de autorradiografía que permiten, además de la cuantificación, la localización de receptores en diversas y múltiples regiones del encéfalo. También ha supuesto un gran avance la disponibilidad de ligandos selectivos para los distintos tipos de receptores opioides.

Con estas nuevas herramientas se ha puesto de manifiesto un desarrollo diferencial de los distintos tipos de receptores opioides. Respecto a los receptores  $\delta$ , la unión a ligandos selectivos no aparece hasta la segunda semana postnatal en la rata y se triplica entre los días 10 y 28 postnatales (Spain y col. 1985). El desarrollo de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  no se completa hasta la tercera y cuarta semana postnatal, respectivamente (Kitchen y col. 1995ab, Kornblum y col. 1987, McDowell y Kitchen 1986, 1987). Se ha sugerido que el destete podría ser, en la rata, un proceso crítico para la maduración del receptor  $\delta$  (Kelly y col. 1998, Kitchen y col. 1994, 1995b, Muhammad y Kitchen 1993b). Existen aún dudas respecto al patrón ontogénico de los receptores  $\kappa$ , de modo que mientras algunos autores le atribuyen un desarrollo tardío, como el de los  $\delta$  (en torno al día 35 postnatal), otros estudios lo consideran temprano (en torno al día 10 postnatal). Estas diferencias podrían ser explicables en función de un patrón diferencial para los subtipos de receptores  $\kappa$  (Kitchen y col. 1990, Spain y col. 1985).

Los estudios ontogénicos del SOE realizados con ratón, han puesto de manifiesto un patrón de desarrollo para el receptor  $\delta$  similar al de la rata. En el caso de animales con

períodos perinatales más largos se ha encontrado una mayor madurez del SOE en el momento del nacimiento (McDowell y Kitchen 1987).

Hasta el momento se ha venido considerando que, en general, las regiones más caudales del encéfalo madurarían antes que las más anteriores (Jacobson 1978). Parece haber indicios de que ésto también sería aplicable a los receptores opioides (ver por ejemplo Bardo y col. 1981,1982), si bien este extremo no está plenamente confirmado y parece haber algunas discrepancias entre el desarrollo de los receptores y los péptidos opioides (Bayon y col. 1979, Loughlin y col. 1985, McDowell y Kitchen 1987).

### 1.1.3. PLASTICIDAD DEL SOE. UTILIDAD DE LOS TRATAMIENTOS CON ANTAGONISTAS.

Es un fenómeno bien conocido la capacidad del SNC de los mamíferos de adaptarse en respuesta a lesiones o a distintos estímulos farmacológicos o ambientales (para revisión ver Baron y col. 1985, Fuller 1984, Giardino y col. 1990, Sharma y col. 1988). Dentro de este contexto, el SOE parece presentar una especial plasticidad o capacidad de ajuste a los distintos estímulos ambientales, farmacológicos o fisiológicos. La plasticidad de los receptores opioides ha sido puesta de manifiesto a través de distintos estudios comportamentales, bioquímicos y morfológicos en la rata adulta (Bardo y col. 1982, 1983ab, Giardino y col. 1990, McDowell y Kitchen 1987, Morris 1991, Sharma y col. 1988, Tang y Collins 1978, Tempel y col. 1982, 1984, Zadina y col. 1985).

Muchos estudios han demostrado que el tratamiento crónico con antagonistas opioides puede incrementar la potencia (supersensibilidad) de los agonistas opioides tanto en sistemas *in vivo* (Bardo y col. 1983ab, Millan y col. 1988, Tang y Collins 1978, Tempel y col. 1985, Yoburn y col. 1985, 1986, 1988, 1989a), como *in vitro* (Schulz y col. 1979). En estudios de *binding* se ha encontrado que estos tratamientos también pueden conducir a un

incremento en la densidad de receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (*up-regulation*) tanto en el SNC (Bardo y col. 1982, 1983ab, Baron y col. 1985, Lahti y Collins 1978, Morris y col. 1988, Tempel y col. 1985, Sharma y col. 1988, Yoburn y col. 1985, 1986, 1989b, Zukin y col. 1982), como en el periférico (Schulz y col. 1979), sin afectar la afinidad. Parece probable que a este incremento del número de receptores le acompañe una elevación de los niveles de opioides endógenos (Bardo y col. 1982, 1983b, Tempel y col. 1985, Sharma y col. 1988, Zagon y McLaughlin 1984). La supersensibilidad y *up-regulation* de receptores opioides se ha observado tras un tratamiento crónico (8 días), pero no tras un tratamiento agudo (1 día) con antagonistas opioides (Bardo y col. 1983b, Yoburn y col. 1990). Por el contrario, en general, se ha observado que la administración crónica de agonistas opioides produce fenómenos de *down-regulation* (Tao y col. 1990, 1998), sin embargo los efectos de dicha administración sobre los niveles de receptores son aún controvertidos y parecen depender del tipo de agonista empleado (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987, Tempel y col. 1988, Zadina y col. 1985). Además, distintos estudios sugieren que la plasticidad de este sistema no presenta las mismas características en las distintas etapas del desarrollo (Bardo y col. 1982, 1983b, Sirinathsinghji y col. 1985, Tempel y col. 1988, Zadina y col. 1985). Como ya hemos comentado, los receptores opioides se encuentran en rápido desarrollo durante las primeras semanas postnatales, por lo que podrían ser más susceptibles a las distintas alteraciones y estas etapas tempranas del desarrollo podrían corresponder a un período de plasticidad única. Los trabajos existentes en la literatura parecen indicar que el receptor  $\mu$  sería el más sensible a los tratamientos farmacológicos neonatales (McDowell y Kitchen 1987, Tempel y col. 1988, Zadina y col. 1985), además de tener un papel importante en la modulación de distintas funciones durante el desarrollo (Bailey y Kitchen 1987, Hammer y col. 1989, McDowell y Kitchen 1987, Roth y col. 1980). Por otra parte se ha postulado que las modificaciones postsinápticas inducidas sobre el sistema opioide podrían tener consecuencias a nivel presináptico, que serían las responsables de las alteraciones

comportamentales observadas a largo plazo (Bardo y col. 1983b, Harry y Rosecrans 1979, Kastin y col. 1980, Meyerson y col. 1988, Sirinathsinghji y col. 1985). Las consecuencias de la plasticidad opioide sobre el estado funcional de otros sistemas de neurotransmisión a nivel central, así como hasta qué punto la actividad de estos sistemas está modulada por una acción tónica opioide, son temas poco conocidos. Aunque los efectos de algunas sustancias tanto agonistas como antagonistas opioides sobre sistemas estrechamente relacionados como los monoaminérgicos, han sido investigados por otros autores tanto en el animal adulto (Baron y col. 1985, Roth y col. 1980, Sharma y col. 1988) como en ratas en la etapa predestete (Bardo y col. 1982, Roth y col. 1980), esta cuestión no está aún resuelta.

El uso de administración crónica de antagonistas opioides ha demostrado ser muy útil para el estudio de las funciones fisiológicas de los péptidos endógenos y de la plasticidad del SOE en ratas. Recientemente se ha resaltado la utilidad de antagonistas no peptídicos de receptores de neuropéptidos, como herramienta para un conocimiento más preciso del papel fisiológico de los péptidos endógenos y su posible utilización en terapia (Betancur y col. 1997). De entre los tres tipos de receptores opioides descritos, el receptor  $\delta$  es el menos conocido. De hecho sólo en los últimos años se ha podido contar con varios compuestos selectivos  $\delta$  de alta afinidad (Erspamer y col. 1989, Portoghese y col. 1988) que permiten un análisis más riguroso de las posibles funciones del receptor  $\delta$ . En concreto, la disponibilidad del naltrindol, antagonista altamente selectivo del receptor  $\delta$ , de naturaleza no peptídica y capaz de atravesar barrera hematoencefálica (Portoghese y col. 1988) resulta de especial utilidad en este tipo de estudios.

Trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación en los que se aplicaron tratamientos crónicos con el antagonista opioide general naltrexona, revelaron interesantes resultados acerca de la implicación del SOE en la modulación de respuestas comportamentales en la rata (De Cabo y col. 1995) y respecto a las interacciones entre el

SOE y sistemas monoaminérgicos centrales a lo largo del desarrollo (De Cabo y col. 1994, Viveros y col. 1995). Más recientemente, mediante la aplicación de un tratamiento crónico con el antagonista selectivo  $\delta$  naltrindol, idéntico al empleado en esta Tesis Doctoral, nuestro equipo de investigación ha estudiado interacciones funcionales entre distintos tipos de receptores opioides en la modulación de respuestas antinociceptivas y neuroendocrinas en ratas hembras neonatales (Antelo 1998, Antelo y col. 1998), y el mismo tipo de tratamiento nos ha permitido mostrar la implicación del receptor  $\delta$  en la modulación de los efectos antinociceptivos y simpaticolíticos inducidos por el agonista  $\alpha_2$  adrenérgico clonidina, en ratas neonatales (Alberti 1999, Alberti y col. 1999).

## **I.2. INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE DIFERENTES TIPOS DE RECEPTORES OPIOIDES.**

Se han acumulado evidencias que sugieren que, bajo determinadas circunstancias, puede existir una interacción física y/o funcional entre los distintos tipos de receptores opioides (Palazzi y col. 1996, Rothman y col. 1993, Traynor y Elliot 1993). Distintos trabajos han demostrado que la potencia antinociceptiva de agonistas  $\mu$  como la morfina puede ser modulada (incrementada o disminuida) por agonistas  $\delta$ . Vaught y Takemori (1979) encontraron que la administración i.c.v. de dosis subanalgésicas de [Leu<sup>5</sup>]-encefalina incrementó la potencia antinociceptiva de la morfina. Posteriormente Lee y sus colaboradores vieron que en contraste con la acción de la [Leu<sup>5</sup>]-encefalina, la administración de dosis subanalgésicas de [Met<sup>5</sup>]-encefalina atenuó los efectos antinociceptivos de la morfina (Lee y col. 1980, Vaught y col. 1982). Estudios posteriores mostraron que dosis subanalgésicas del agonista  $\delta$  DPDPE incrementaron la potencia antinociceptiva de la morfina, mientras dosis del agonista  $\delta$  [D-Ala<sup>2</sup>,Met<sup>5</sup>]-encefalinamida que no producen antinocicepción, la redujeron. Los efectos moduladores fueron bloqueados

por la administración i.c.v del antagonista  $\delta$  ICI 174, 864 (Porreca y col. 1987b, Heyman y col. 1989ab), mientras que en estos estudios el ICI 174,864 no tuvo efectos antinociceptivos "per se", y no antagonizó o potenció directamente la antinocicepción inducida por morfina (Heyman y col. 1989ab). También se ha observado que distintos agonistas del receptor  $\delta$  modulan positivamente o negativamente la eficacia antinociceptiva de agonistas  $\mu$  como la morfina (Jiang y col. 1990ab). Estas modulaciones de nuevo parecen mediadas por los receptores  $\delta$ , ya que el antagonista  $\delta$  ICI 174,864 las bloquea y sin embargo aquí como en otros trabajos (Heyman y col. 1987a) este antagonista no tuvo efecto sobre la analgesia inducida por morfina (Jiang y col. 1990a). Otros estudios encuentran que cuando se coadministraron los agonistas  $\delta$  BW373U86 y  $\mu$  fentanil, la actividad convulsiva del BW373U86 fue atenuada por el fentanil de forma dosis dependiente, y que el efecto *Straub* inducido por fentanil fue antagonizado por BW373U86. Asimismo, la coadministración potenció la actividad analgésica en la placa caliente (O'Neill y col. 1997). De acuerdo con estos estudios, se ha visto que la administración de dosis subanalgésicas de los agonistas selectivos  $\mu$  demorfina y  $\delta$  [D-Ala<sup>2</sup>,Glu<sup>4</sup>]-deltorfina, produce antinocicepción en el *test* de la retirada de la cola de calor radiante, en el que el agonista  $\delta$  actúa como un agonista extremadamente débil (Negri y col. 1995).

También se ha observado cooperación  $\mu$ - $\delta$  en la inhibición opioide de la propulsión intestinal (Heyman 1987) y en la contracción de la vejiga urinaria (Sheldon y col. 1989). Holaday y D'Amato (1983) describieron interacciones  $\mu$ - $\delta$  en la modulación del *shock* endotóxico en la rata y Kamei y sus colaboradores (1993) demostraron la modulación de la actividad antitusiva de agonistas opioides  $\mu$ , por agonistas opioides  $\delta$  en ratón. En ratas, el pretratamiento con morfina o con el agonista selectivo  $\mu$  demorfina, produjo sensibilización a los efectos comportamentales del agonista selectivo  $\delta$  [D-Ala<sup>2</sup>, Glu<sup>4</sup>]-deltorfina (Melchiorri y col. 1992).

La capacidad de los agonistas  $\delta$  para producir antinocicepción directamente, así

como para modular (incrementar o disminuir) la antinocicepción mediada por receptores  $\mu$ , junto con los datos de estudios de *binding* que demuestran una aparente interacción no competitiva entre los sitios de unión  $\mu$  y  $\delta$  (Rothman y Westfall 1982ab), llevan a la hipótesis de que dicha modulación ocurre a través de receptores  $\delta$  que forman un complejo opioide receptor con los receptores  $\mu$ , con los que interactúan (Vaught y col. 1982). Así, Rothman y sus colaboradores (1988) sugirieron que los receptores  $\delta$  pueden existir de forma independiente o bien en un estado asociado con los receptores  $\mu$ . Estos receptores separados o asociados fueron denominados  $\delta_{ncx}$  (receptor no complejo) y  $\delta_{cx}$  (receptor complejo) respectivamente. Por otro lado, ya hemos comentado que los estudios farmacológicos sugieren la existencia de dos subtipos de receptores  $\delta$ , el  $\delta_1$  (sensible a DPDPE y DALCE) y el  $\delta_2$  (sensible a deltorfina II y 5'-NTII) (Mattia y col. 1992). Se han utilizado nuevos antagonistas selectivos de estos subtipos de receptores, con el objetivo de identificar el subtipo involucrado en la acción moduladora. Dado que la modulación positiva (incremento en potencia) y negativa (disminución de la potencia) de la antinocicepción inducida por morfina fue antagonizada por 5'-NTII pero no por DALCE, los datos sugieren que el receptor implicado corresponde al  $\delta_2$  (Porreca y col. 1992). Otros resultados apoyan esta hipótesis (Zaki y col. 1996, Negri y col. 1995), sin embargo existe controversia ya que en otros estudios se ha encontrado una implicación predominante del subtipo  $\delta_1$  (Suzuki y col. 1995b).

En ratón, las respuestas antinociceptivas al sufentanil, meperidina, metadona y a los péptidos selectivos  $\mu$  DAMGO y PLO17, no fueron afectadas por la administración del agonista  $\delta$  DPDPE, mientras que este agonista potenció los efectos antinociceptivos producidos por los agonistas  $\mu$  morfina y normorfina, en el *test* de la inmersión de la cola en agua caliente (Heyman y col. 1989b). De la misma forma Adams y colaboradores han informado de una cooperación positiva entre el DPDPE y la morfina en el *test* de retirada de la cola de agua fría en ratón, pero sorprendentemente no se observó interacción  $\mu$ - $\delta$

utilizando otros agonistas distintos a la morfina y normorfina (Adams y col. 1993). Esto ha llevado a proponer que existirían receptores  $\mu$  asociados en un complejo receptor con los receptores  $\delta$  ( $\mu_{cx}$ ) y receptores  $\mu$  que no formarían dicho complejo ( $\mu_{ncx}$ ) (Rothman y col. 1987). El receptor  $\mu_{cx}$  debe ser un subtipo específico de receptor  $\mu$  que se activa únicamente por algunos agonistas. Este receptor no parece corresponder al definido farmacológicamente como  $\mu_1$  (Pasternak 1980), dado que el DPDPE continúa incrementando la antinocicepción inducida por morfina en presencia de un antagonista  $\mu_1$  (Hahn y col. 1982), sino que más bien se sugiere que corresponde al subtipo  $\mu_2$  (Heyman y col. 1989a).

Por otra parte, otros estudios realizados en ratas adultas no revelaron interacciones cooperativas entre el DPDPE y el agonista  $\mu$  PLO17 en los *test* de retirada de la cola de agua fría y caliente, aunque ambos péptidos actuaron como agonistas en el *test* de inmersión de la cola en agua fría (Adams y col. 1993). Hay que tener en cuenta que no todos los *test* antinociceptivos son igualmente sensibles a los agonistas  $\delta$ , mientras que pueden ser muy sensibles a los agonistas  $\mu$ . Por ejemplo, el *test* de la placa caliente en ratón y rata, el *test* de la retirada de la cola de agua fría en rata, y el *test* de retirada de la cola de agua caliente en ratón, son sensibles a agonistas opioides  $\delta$ , mientras los *test* de retirada de la cola de agua caliente y calor radiante en ratas son poco o nada sensibles a estos agonistas (Calcagnetti y col. 1990, Heyman y col. 1987b, Negri y col. 1991). Así, cuando el dolor fue producido en ratas por inmersión de la cola en agua caliente, no se encontraba sinergismo entre la morfina y DPDPE (Adams y col. 1993). Igualmente, en el *test* de la retirada de la cola de calor radiante no se observó una antinocicepción cooperativa entre péptidos opioides  $\mu$  y  $\delta$  selectivos.

Así pues, existen evidencias indirectas que indican que los receptores opioides no necesariamente actúan independientemente unos de otros. Por otra parte, la posible acción coordinada entre estos receptores parece compleja y, dada su importante aplicación

---

terapéutica, necesita ser clarificada.

Los ratones mutantes en los que se elimina el gen que codifica para uno de los receptores opioides, *Knockout* para ese receptor, constituyen una herramienta única para determinar si los receptores opioides interaccionan funcionalmente. Si así fuera, en ratones *Knockout* para el receptor  $\mu$ , por ejemplo, las respuestas funcionales a agonistas  $\delta$  y  $\kappa$  deberían estar alteradas.

Se ha demostrado que en los ratones *Knockout*  $\mu$  están presentes los receptores  $\delta$  y  $\kappa$ , y que no se modifican significativamente ni sus niveles de expresión ni su distribución. Sin embargo, en algunas regiones se observó una disminución en la densidad de receptores  $\delta$  y  $\kappa$ , lo que apoya la posibilidad de cooperatividad entre distintos receptores. Así, se ha observado una correlación pequeña pero significativa, entre los cambios en los receptores  $\delta$  existentes en ratones *Knockout*  $\mu$  y el nivel de expresión de los receptores  $\mu$  en ratones normales, sugiriendo que en las regiones con mayor densidad de receptores  $\mu$ , existe alguna modulación de la expresión de receptores  $\delta$  (Kitchen y col. 1997). Por otra parte, mientras que unos estudios autorradiográficos demuestran que la falta de los receptores  $\kappa$  no produce cambios compensatorios detectables en la expresión de los otros tipos de receptores opioides (Simonin y col. 1998), otros hablan de pequeños incrementos en la densidad de receptores  $\delta$  en regiones no corticales (Slowe y col. 1999).

La ausencia de receptores  $\mu$  se ha visto que no interfiere significativamente en el acoplamiento de los receptores  $\delta$  y  $\kappa$  a la proteína G, de forma que la activación de ambos receptores activa la proteína G en cerebros y médula espinal de ratones *Knockout* para el receptor  $\mu$  (Matthes y col. 1998). También se encontró que agonistas  $\delta$  y  $\kappa$  inhibieron significativamente la actividad de la adenilato ciclasa, sin encontrarse modificaciones significativas de dicha capacidad inhibitoria en estos ratones mutantes (Matthes y col. 1998). Sin embargo la acción de la deltorfina II sobre la función respiratoria fue anulada en los ratones mutantes (Matthes y col. 1998), pese a la presencia de receptores  $\delta$  en los

centros respiratorios (Kitchen y col. 1997), lo que indica que la presencia de los receptores  $\mu$  es necesaria para la modulación de la respiración mediada por receptores  $\delta$  (Matthes y col. 1998).

La antinocicepción mediada por receptores  $\kappa$  no es modificada por la ausencia de receptores  $\mu$ , al menos en respuesta a estímulos térmicos agudos. Tampoco se vio modificada la modulación de la función respiratoria por los receptores  $\kappa$ . Estos resultados sugieren que estas propiedades funcionales del receptor  $\kappa$  se mantienen en ratones mutantes y que el receptor  $\kappa$  actúa independientemente del receptor  $\mu$ . (Matthes y col. 1998). En la literatura relativa a la posible cooperatividad entre receptores opioides, existen pocas indicaciones acerca de las interacciones  $\mu$ - $\kappa$  en comparación con las interacciones  $\mu$ - $\delta$ . De los estudios con estos ratones *Knockout* para el receptor  $\mu$ , se deduce que si existen interacciones  $\mu$ - $\kappa$ , no parecen tener influencia sobre el acoplamiento de receptores o el control de la nocicepción y la respiración *in vivo* (Matthes y col. 1998). Hay que destacar, sin embargo, que esto no quiere decir que no exista interacción en otras respuestas. Así, resulta interesante la diferente abstinencia a morfina presentada por los *Knockout*  $\mu$  (Matthes y col. 1998) y los *Knockout*  $\kappa$  (Simonin y col. 1998). El síndrome de abstinencia a morfina fue abolido en los *Knockout*  $\mu$ , lo que indica que la dependencia a morfina no surge de la activación no selectiva de los receptores  $\delta$  o  $\kappa$ , y fue atenuada en los *Knockout*  $\kappa$ , lo que sugiere una actuación sinérgica de receptores  $\mu$ - $\kappa$  en la dependencia a morfina (Simonin y col. 1998).

Existen tres estudios que describen la analgesia mediada por receptores  $\delta$  en ratones *Knockout*  $\mu$  (Loh y col. 1998, Matthes y col. 1998, Sora y col. 1997a). La analgesia espinal (medida por la respuesta de retirada de la cola) producida por los agonistas selectivos  $\delta$  DPDPE (Loh y col. 1998, Matthes y col. 1998, Sora y col. 1997a) y deltorfina II (Sora y col. 1997a), se vio inalterada (Loh y col. 1998), ligeramente disminuida (Matthes y

col. 1998) o severamente reducida (Sora y col. 1997a) en los animales mutantes, en comparación con los ratones normales. Los dos últimos estudios sugieren que es necesaria la presencia de receptores  $\mu$  para obtener una analgesia  $\delta$  completa en la respuesta de retirada de la cola. Hay que destacar que los efectos antinociceptivos de los agonistas  $\delta$  en los ratones normales fueron antagonizados por naltrindol, por tanto dichos efectos no fueron consecuencia de la acción no selectiva de los agonistas sobre los receptores  $\mu$  (Matthes y col. 1998). La respuesta antinociceptiva supraespinal (salto en la placa caliente), valorada en un experimento paralelo, se vio disminuida (Sora y col. 1997a) o preservada (Loh y col. 1998, Matthes y col. 1998) en los ratones mutantes. Estos resultados indican que las interacciones  $\mu$ - $\delta$  no están implicadas de la misma manera en respuesta a diferentes estímulos nocivos. Las discrepancias encontradas en estos trabajos, posiblemente sean consecuencia de los distintos diseños experimentales utilizados. En cualquier caso, de estos estudios se deduce la existencia de interacciones sinérgicas entre los receptores  $\mu$ - $\delta$ , que se revelan bajo ciertas condiciones experimentales.

Todavía no está claro si la interacción entre receptores tiene lugar entre receptores distantes localizados en neuronas separadas o surge de interacciones entre receptores a nivel celular. Los datos de *binding* sugieren acoplamientos alostéricos entre los receptores (Rothman y col. 1993) y estudios de inmunohistoquímica sugieren la colocalización de los receptores opioides en algunas neuronas (Ji y col. 1995). Así, tanto los receptores  $\mu$  como los  $\delta$  se han identificado en neuronas de bulbo respiratorio (Morin-Surum y col. 1984). Si la interacción  $\mu$ - $\delta$  ocurre entre poblaciones de receptores  $\mu$  y  $\delta$  coexpresados en las mismas neuronas, podríamos esperar que la transducción de las señales tras la activación del receptor  $\delta$  se viera afectada en ratones *Knockout* para el receptor  $\mu$ . Sin embargo no se han observado, como ya hemos comentado, alteraciones de la activación de proteína G o de la inhibición de la adenilato ciclasa por agonistas  $\delta$  en ratones *Knockout* para el receptor  $\mu$ . Por tanto, parece que el sinergismo entre los receptores  $\mu$ - $\delta$  implica distintas células que se

encuentran asociadas funcionalmente dentro de la red neuronal. Aún queda por clarificar el modo preciso de interacción entre los receptores, para lo que resultarán especialmente útiles ratones *Knockout* para varios receptores opioides (Kieffer 1999).

Una buena aproximación experimental al estudio de la interacción entre los distintos tipos de receptores opioides corresponde a la utilizada en esta Tesis Doctoral. La administración crónica del antagonista  $\delta$  naltrindol, que a la dosis utilizada en este trabajo conduce al bloqueo de los receptores  $\delta$  sin afectar a los  $\mu$  (Crook y col. 1992), y el estudio posterior de distintas respuestas (antinociceptivas y comportamentales) inducidas por agonistas  $\mu$  y  $\kappa$ , constituye un diseño experimental apropiado para el estudio de las interacciones entre los receptores opioides  $\delta$ - $\mu$  y  $\delta$ - $\kappa$ . Este tipo de interacciones ha sido estudiado en roedores adultos, pero existe muy poca información en la literatura respecto a la interacciones funcionales entre receptores durante el período neonatal. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación encontramos que un tratamiento crónico con naltrindol durante los 19 primeros días de vida, no modificó la antinocicepción inducida por el agonista  $\mu$  alfentanil, en ratas hembras neonatales de 20 días de edad (Antelo y col. 1998). Hay que tener en cuenta la influencia que parece tener el sexo sobre la nocicepción y la modulación del dolor (Bodnar y col. 1988, Cicero y col. 1997, Fillingim y Maixner 1995, Mogil y Belknap 1997, Romero y col. 1988), así como la existencia de diferencias sexuales en cuanto al desarrollo y densidad de receptores opioides (De Cabo y col. 1992a, Hammer 1990, Limonta y col. 1991, Rimanóczy y Vathy 1995), por lo tanto los resultados obtenidos en hembras no son extrapolables a machos. Así, en la presente Tesis Doctoral se estudiarán las interacciones funcionales  $\mu$ - $\delta$  en animales neonatales de ambos sexos. Dado que la modulación de la antinocicepción mediada por el receptor  $\mu$  por parte de agonistas  $\delta$ , también parece depender del agonista  $\mu$  específico empleado (Heyman y col. 1989b, Malmberg y Yaksh 1992, Traynor y Elliot 1993), estas interacciones se estudiarán utilizando distintos agonistas  $\mu$  (alfentanil y morfina).

También se han encontrado efectos de la manipulación neonatal sobre la nocicepción, y se han observado diferencias sexuales en este aspecto. Así, se encontró que hembras adultas manipuladas en la infancia, presentaron mayores latencias de lamida de patas en el *test* de la placa caliente, mientras que en los machos estas latencias no se modificaron significativamente (Smythe y col. 1994). En un trabajo reciente, nosotros hemos observado que la manipulación neonatal incrementó la sensibilidad al dolor (prueba de inmersión de la cola) en animales neonatales de ambos sexos y que las ratas macho neonatales mostraron una mayor vulnerabilidad que las hembras, a los efectos de la manipulación sobre las respuestas antinociceptivas y simpaticolíticas inducidas por clonidina (Alberti y col. 1999).

Dada la importancia que parece tener la manipulación de los animales tanto en la sensibilidad al dolor como en su modulación, en los experimentos en los que estudiaremos los efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre las respuestas antinociceptivas a morfina en animales de 20 días, incluimos en el diseño experimental grupos de animales no manipulados.

La mayoría de los estudios realizados en roedores adultos sobre interacciones entre receptores  $\mu$ - $\delta$  en relación con la antinocicepción, han utilizado como pruebas nociceptivas la inmersión de la cola en agua caliente, y el *test* del *tail-flick* (Heyman y col. 1989a, Kamei y col. 1992, Negri y col. 1995, Porreca y col. 1987b), que sólo permiten registrar respuestas que son esencialmente reflejos coordinados a nivel espinal y proporcionan poca información sobre el componente afectivo/emocional del dolor. La implicación del receptor  $\delta$  y sus posibles interacciones con el receptor  $\mu$  en las respuestas afectivas al dolor son menos conocidas. En la presente Tesis Doctoral, la combinación en el diseño experimental de un tratamiento crónico con naltrindol y el *test* de la estimulación eléctrica de la cola, que permite el estudio de diferentes reacciones al dolor integradas a diferentes niveles del SNC (Borszcz 1995, Carrol y Lim 1960, Naranjo y col. 1982, Millan 1990, Noble y col. 1997), para

el estudio de respuestas antinociceptivas a morfina, con especial interés en la dimensión afectiva del dolor, supone una nueva aproximación al estudio de las interacciones  $\mu$ - $\delta$  en el animal adulto.

### **I.3. RELACIONES ENTRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL (HHA) Y EL SOE.**

#### **I.3.1. DESARROLLO DE LA RESPUESTA ADRENOCORTICAL EN LA RATA.**

Está relativamente bien establecido, a partir de abundantes datos experimentales, que en la rata existe un período de hiporreactividad del eje HHA, durante el período postnatal temprano. Según algunos autores, dicho período comienza aproximadamente el día 2 de edad y continúa hasta el día 14 de vida postnatal (Sapolsky y Meaney 1986), de forma que estas dos primeras semanas se caracterizan por concentraciones basales de corticosterona bajas y una ausencia de respuesta o respuesta disminuida de corticosterona a diversos agentes estresantes. Este período se ha denominado período de no respuesta o de hiporreactividad al estrés (para revisión ver Sapolsky y Meaney 1986, Schapiro 1968), de manera que durante este intervalo el estímulo necesario para inducir una respuesta adrenocortical al estrés es inusualmente alto. Hay que tener en cuenta la influencia de los glucocorticoides sobre el crecimiento y el desarrollo del SNC. Ratas tratadas con glucocorticoides durante la primera semana de vida presentan un peso cerebral y un contenido en ADN permanentemente reducidos (Ardeleanu y Sterescu 1978, Balazs y Cotterrell 1972, Cotterrel y col. 1972, Howard y Benjamin 1975). La reducción en el contenido de ADN parece deberse a la supresión de la división celular, por lo que este efecto se acentúa en regiones con alta frecuencia de mitosis como son el cerebelo y el giro dentado del hipocampo (Bohn 1980, Bohn y Lauder 1978, Weichsel 1974). Además, la mielinización neuronal, que depende de la división celular

postnatal, también disminuye tras el tratamiento con corticosterona durante la primera semana de vida (Howard y Benjamin 1975). El tratamiento con glucocorticoides durante estos primeros días de vida también afecta la morfogénesis neural, reduciendo el número de espinas dendríticas de células piramidales en varias regiones cerebrales. Todos estos efectos se ha visto que influyen en el desarrollo comportamental. Así, animales expuestos a altos niveles de glucocorticoides durante la primera semana postnatal muestran un comportamiento social alterado (Meaney y col. 1981) y se ve perjudicado el rendimiento en distintos paradigmas de aprendizaje (Olton y col. 1974). El período de hiporrespuesta al estrés constituye por tanto un mecanismo protector que asegura unos niveles bajos y estables de glucocorticoides durante el desarrollo postnatal temprano (Schapiro 1971, Sapolsky y Meaney 1986).

Existen algunas diferencias, dependiendo de los autores, en cuanto a la posible duración del período de hiporreactividad al estrés en animales jóvenes. Tales diferencias podrían deberse al tipo de agente estresante utilizado y/o, en su caso, al estudio directo de la respuesta de corticosterona a ACTH (Allen y Kendall 1967, Bailey y Kitchen 1987, Haltmeyer y col. 1966, Henning 1978, Iny y col. 1987, Kakihana y col. 1974, Walker y col. 1986), pero parece deducirse que hay un cierto acuerdo general en que es en la tercera semana postnatal cuando la respuesta de corticosterona al estrés está bien establecida. Por esta razón, en esta Tesis Doctoral hemos elegido la edad de 25 días para realizar las valoraciones de corticosterona, de forma que pudiéramos garantizar que nos encontrábamos fuera del período de no reactividad desde el punto de vista de la respuesta adrenocortical.

### I.3.2. IMPLICACIÓN DIFERENCIAL DE LOS DISTINTOS TIPOS DE RECEPTORES OPIOIDES EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA CORTICOADRENAL.

Existen abundantes datos que indican que el SOE está implicado en la regulación del sistema HHA en mamíferos. Sin embargo, la naturaleza exacta de este papel funcional

es todavía objeto de controversia.

En la rata se ha observado que la secreción de corticosterona basal e inducida por estrés está modulada por la administración aguda de agonistas (Eisenberg 1985, Kokka y col. 1973, Pechnick y col. 1985) y antagonistas opioides (Eisenberg 1980, Jezova y col. 1982, Siegel y col. 1982). Existen desacuerdos en la literatura respecto a los efectos de dichos compuestos ya que parecen depender de la especie estudiada, la dosis, el tiempo de acción elegido, situación experimental y el agente estresante utilizado (Gibson y col. 1979, Kitchen y Rowan 1984, Siegel y col. 1982). En general, se ha observado que la administración aguda de agonistas opioides incrementa los niveles plasmáticos de corticosteroides (Ferri y col. 1982, Guaza y col. 1979, Hayes y Stewart 1985) y potencia los incrementos en la secreción de corticosteroides que ocurren en respuesta al estrés (Buckingham 1982). Así, se ha visto que la administración intracerebroventricular de leu-enkefalina y met-enkefalina aumenta la concentración sérica de corticosterona (Gadek-Michalska y Bugajski 1996), y la administración de los agonistas  $\mu$  DAMGO (Eisenberg 1993) y TRIMU 5 (Eisenberg 1994) produce incrementos en los niveles de corticosterona plasmáticos. Por otro lado el tratamiento prolongado con morfina causa un descenso en los niveles basales de corticosterona y una reducción de la respuesta adrenocortical al estrés (Buckingham y Cooper 1984a). En animales neonatales (10 días de edad), se ha observado que tanto la morfina como el agonista  $\kappa$  U50-488H producen incrementos en la secreción de ACTH y corticosterona (Adamson y col. 1991). El antagonista opioide naloxona paradójicamente, también causa incrementos en los niveles basales de corticosteroides (Eisenberg 1980, Gibson y col. 1979, Jezova y col. 1982, Montilla y col. 1989, Siegel y col. 1982) y se ha visto que puede tanto estimular como inhibir la respuesta del eje HHA al estrés, dependiendo de la especie y la dosis utilizada (Buckingham y Cooper 1984b, Gibson y col. 1979, Kitchen y Rowan 1984, Siegel y col. 1982, Tapp y col. 1981). No parece que la modulación de estas respuestas por los opioides tenga lugar en las glándulas adrenales

(Gibson y col. 1979), ni en la hipófisis (Buckingham 1982), más bien parece que los efectos se producen a nivel del hipotálamo, influyendo en la liberación de CRH (Buckingham 1982, Siegel y col. 1982).

Se dispone de poca información acerca del tipo específico de receptor opioide implicado en la modulación de la respuesta adrenocortical al estrés en ratas neonatales. Ciertos datos sugieren que son los receptores  $\mu$  más que los  $\delta$ , los implicados en la modificación de las respuestas de corticosterona en ratas (Degli Uberti y col. 1995) y ratones adultos (Hart y col. 1985, Kitchen y Rowan 1984).

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, han puesto de manifiesto la importancia de las consecuencias de la plasticidad del SOE sobre otros sistemas neuroquímicos y neuroendocrinos sobre los que los opioides parecen jugar un importante papel modulador (Antelo y col. 1998, De Cabo y col. 1994, 1995, Viveros y col. 1995). Es bien conocido el hecho de que las situaciones estresantes ya sean de tipo físico o psíquico producen activación de todo el eje suprarrenal. Nuestro grupo de investigación ha encontrado que la prueba de natación forzada (natación en agua a 20°C durante 3 minutos) produce analgesia inducida por estrés (AIE) (Antelo y col. 1998), así como un aumento de corticosterona en suero, en ratas hembras neonatales (Antelo 1998). Por otra parte, en estos mismos animales (hembras de 25 días de edad), encontramos que el bloqueo funcional del receptor  $\delta$  durante el período predestete, mediante un tratamiento neonatal con el antagonista naltrindol, produjo una inhibición tanto de la AIE como de la respuesta de corticosterona al estrés de natación forzada (Antelo 1998).

En la presente Tesis Doctoral, se presentan datos sobre un estudio paralelo al recién citado, pero realizado en machos de la misma edad (25 días). Es decir, mediante la aplicación del mismo tratamiento neonatal con naltrindol y el mismo protocolo de estrés que en nuestro anterior trabajo en hembras (Antelo 1998), hemos intentado detectar posibles diferencias sexuales en la modulación del eje HHA por parte del receptor  $\delta$ . Por otra parte,

hemos estudiado las posibles alteraciones de la actividad adrenocortical de animales adultos sometidos a un tratamiento crónico con el antagonista naltrindol. En el diseño de estos estudios se contemplaron los efectos de dicho tratamiento tanto a largo como a corto plazo.

### I.3.3. EFECTOS DE LA MANIPULACIÓN NEONATAL SOBRE LA ACTIVIDAD DEL EJE HHA.

Se sabe que la manipulación de los animales durante períodos tempranos del desarrollo puede inducir alteraciones neuroendocrinas y comportamentales permanentes hasta la edad adulta. La manipulación durante períodos críticos del desarrollo puede producir una aparición temprana de pelo corporal, adelantar la apertura de los ojos, la locomoción, la aparición de la pubertad etc. Muchos de los efectos comportamentales y fisiológicos, pueden ser producidos por el simple tratamiento de coger las crías durante pocos minutos al día durante la primera semana de vida. También se ha encontrado que la manipulación puede modificar la sensibilidad a las propiedades reforzantes de las drogas de abuso, de forma que animales adultos manipulados en la infancia presentan una atenuación en la preferencia de lugar condicionada en respuesta a anfetamina (Campbell y Spear 1999), así como un consumo disminuido de alcohol (Hilakivi-Clarke y col. 1991). Por otra parte, diversos estudios ponen de manifiesto la influencia de la manipulación en la actividad del eje HHA.

Se ha sugerido que los efectos de la manipulación pueden producirse por las consecuencias de dicha manipulación sobre el comportamiento maternal para con las crías. Así, las madres con camadas manipuladas lamen y asean más a menudo a sus crías que las madres de camadas no manipuladas (para revisión ver Denenberg 1999). Se ha comprobado que las crías que recibieron una mayor estimulación maternal en la infancia

presentaron niveles de ACTH, corticosterona y  $\text{RNA}_m$  para la CRH disminuidos (Denenberg 1999). También se han observado diferencias sexuales en los efectos producidos por la manipulación temprana (Mcintosh y col. 1999, Shalev y col. 1998). Por ejemplo, se han descrito diferencias sexuales en los niveles de corticosterona tras estímulos estresantes como la restricción, encontrándose niveles de corticosterona superiores en hembras (Aloisi y col. 1998).

Se sabe que la manipulación produce un incremento permanente de sitios de unión para glucocorticoides en el hipocampo y la corteza frontal en ratas (Meaney y col. 1985ab, Smythe y col. 1996). Los resultados experimentales obtenidos hasta el momento, sugieren que la manipulación neonatal disminuye la actividad del eje HHA en respuesta al estrés y esta respuesta disminuida está asociada con la mencionada densidad incrementada de receptores glucocorticoides hipocampales, lo que facilita el *feed-back* negativo que restringe la liberación de corticosterona (Sapolski y col. 1984, 1985), y un contenido en CRH en la eminencia media disminuido (Meaney y col. 1985ab, Smythe y col. 1996). Por tanto, la manipulación postnatal parece producir un incremento en la sensibilidad del *feed-back* negativo del SNC (Meaney y col. 1992). Se ha observado que los animales adultos manipulados durante la infancia presentan una secreción disminuida de corticosterona en respuesta a determinados estímulos estresantes (Durand y col. 1998, Meaney y col. 1989, Nuñez y col. 1996, Steimer y col. 1998, Vallee col. 1997) y que en estos animales se restablecen más rápidamente los niveles de corticosterona (Campbell y Spear 1999). Es posible, por tanto, que la manipulación temprana provea a los animales de un control más sensible de la liberación de corticosteroides en respuesta al estrés. Así, diversos resultados experimentales sugieren que ciertos tipos de manipulación hacen que los animales respondan más rápidamente cuando se aplica un agente estresante y que se observe un retorno más rápido a los niveles basales cuando termina el estrés. Además, los animales manipulados ajustan de forma más fina la magnitud de la respuesta adrenocortical al estrés

en función de la intensidad del estrés que se aplica (Gray 1991).

Por otra parte, los animales adultos manipulados en la infancia responden a ambientes novedosos con un comportamiento de inhibición reducido y presentan niveles de ansiedad y emotividad más bajos (Aguiar y col. 1997, Durand y col. 1998, Ferre y col. 1995, Meaney y col. 1991, Nuñez y col. 1995, Shalev y col. 1998, Steimer y col. 1998, Vallee y col. 1997).

Todos estos efectos presumiblemente benefician al animal, proporcionándole una mayor capacidad para enfrentar las situaciones estresantes, protegiéndole de los potenciales efectos dañinos de los esteroides adrenales y asegurándole la integridad anatómica de estructuras cerebrales involucradas en las funciones cognitivas (Meaney y col. 1991). Es interesante el hecho de que el estrés durante la gestación parece tener los efectos opuestos en los animales en edad adulta, esto es, una respuesta incrementada de corticosterona frente a estímulos estresantes así como unos niveles mayores de emotividad (Vallee y col. 1997).

Casi todos los estudios que hemos encontrado en la literatura hablan de los efectos de la manipulación temprana, en muchos casos el aislamiento maternal, sobre la respuesta del eje HHA o el comportamiento frente a estímulos estresantes en el animal adulto, pero hemos encontrado menos datos acerca de los efectos de dicha manipulación en el animal neonatal. Existe un estudio que indica que el aislamiento de las crías de la madre, durante 1 hora al día, desde el día 2 al 8 postnatal, produjo un aumento en la respuesta de corticosterona al estrés en animales aislados frente a los no manipulados, a la edad de 9 días. En este trabajo también se ponen de manifiesto diferencias importantes entre distintos tipos de manipulación, dado que animales manipulados pero no aislados de la madre no presentaron modificaciones en la respuesta de corticosterona al estrés frente a los no manipulados (McCormick y col. 1998). Levine y sus colaboradores han encontrado que uno de los efectos que tiene la manipulación de los animales en edades tempranas es la

aceleración de la maduración del sistema hipófiso-adrenal. Por ejemplo, la respuesta adrenocortical que sigue al estrés por frío no ocurre antes del día 16 de edad en animales no manipulados, pero ocurre a los 12 días de edad si los animales se manipulan durante los primeros días de vida. También vieron que en animales manipulados de 3 días de edad el *shock* eléctrico causó un incremento de las hormonas adrenocorticales circulantes, mientras los animales no manipulados no respondían a esta edad (ver para revisión Gray 1991).

Así pues, en función de los datos expuestos, particularmente teniendo en cuenta la influencia de diferentes tipos de tratamientos neonatales en la maduración del eje HHA (Gray 1991) y los datos que indican la existencia de dimorfismo sexual en la función del eje HHA en animales adultos (Viveros y col. 1988), en esta Tesis Doctoral se han realizado estudios paralelos en animales neonatales de ambos sexos, con objeto de estudiar los efectos de la manipulación que supone nuestro tratamiento neonatal, sobre la actividad adrenocortical.

#### **I.4. MODULACIÓN DE RESPUESTAS COMPORTAMENTALES POR EL SOE. CORRELACIONES NEUROQUÍMICAS.**

##### **I.4.1. IMPLICACIÓN DIFERENCIAL DE DIFERENTES TIPOS DE RECEPTORES OPIOIDES EN LA MODULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO.**

Muchos trabajos ponen de manifiesto la participación del sistema opioide en el control de diversos aspectos del comportamiento. En este sentido, se ha encontrado que los péptidos opioides son liberados en respuesta a una reacción adaptativa a diferentes situaciones estresantes (Fanselow y Bolles 1979, Kato y col. 1990, Sunal 1986), y podrían facilitar la exploración de ambientes nuevos o adversos (Van Abeelen 1989), de manera que se ha encontrado que la administración de agonistas opioides incrementa la exploración de

ambientes nuevos, mientras antagonistas como la naloxona o la naltrexona reducen este comportamiento (Ajayi y Ukponmwan 1994, Bardo y col. 1989, Lukaszewska y Klepaczewska 1997). Además en humanos se ha observado que bajas dosis de sustancias opioides tienen propiedades ansiolíticas y antidepresivas, mientras que la administración de antagonistas como la naltrexona podrían tener el efecto opuesto (Emrich y Schmauss 1991, Hollister y col. 1981). Se ha estudiado la modulación opioide de la actividad general, especialmente de la locomoción y la actividad horizontal, pero hasta el momento se han extraído pocas conclusiones de estos estudios, debido a que tanto los agonistas opioides como los antagonistas pueden producir efectos diferentes dependiendo de las variables experimentales y las condiciones específicas de los experimentos realizados. Por otra parte, algunos de estos compuestos presentan acciones bifásicas a lo largo del tiempo o efectos opuestos por modificaciones en la dosis administrada. Estudios recientes utilizando agonistas selectivos de los diversos receptores opioides, administrados en determinadas áreas cerebrales, han demostrado que las acciones de los opioides sobre la locomoción y la ansiedad parecen depender del tipo de receptor y de la región cerebral estudiada (Calenco-Choukroun y col. 1991, Meyer y Meyer 1993ab, Mickley y col. 1990, Morelli y col. 1989). Así, se ha encontrado que los agonistas  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  exhiben actividad bifásica para la ambulación, postura erguida y esterotipias (Havemann y Kuschinsky 1985, Iwamoto 1981, Meyer y col. 1994, 1995ab, Meyer y Meyer 1993ab, Michael-Titus y col. 1989, Szekely y col. 1980). En cuanto a los efectos de la morfina se ha visto que son muy inconsistentes, ya que en algunos casos incrementa la locomoción (Ferber y Kuschinsky 1995, Honkanen y col. 1995, Klitenick y Wirtshafter 1995, Kuribara 1995, Volterra y col. 1984, Winsky y Holmes 1995) y la suprime en otros (Abbott y Guy 1995, Chesire y col. 1995, Ferber y Kuschinsky 1995, Haney y Miczek 1995, Kuribara 1995). Hay un cierto acuerdo en que dosis bajas o moderadas de morfina estimulan la actividad locomotora, mientras que dosis altas producen un efecto bifásico, de manera que se observa una depresión inicial de la actividad seguida

de un período de actividad incrementada (Brady y Holtzman 1981, Hecht y Schiorring 1979, Iwamoto 1984, Ostrowski y col. 1982, Szekely y col. 1980). Igualmente, se han encontrado resultados inconsistentes para el agonista selectivo  $\mu$  DAMGO, y se ha visto la importancia del área cerebral donde es administrado. Así, la microinyección del agonista en el núcleo accumbens inhibió la activación motora, pero en la sustancia gris periacueductal el efecto dependió de la dosis, de forma que una dosis alta de DAMGO suprimió la locomoción, pero una dosis baja la estimuló (Johnson y col. 1995). También se ha encontrado que los efectos de los agonistas opioides parecen depender del nivel de estrés a que están sometidos los animales, ya que en animales mantenidos en las jaulas de alojamiento, es decir en un ambiente familiar, la infusión de DAGO produjo hiperactividad locomotora, sin embargo cuando los animales fueron expuestos a ambientes inductores de miedo (campo abierto) los efectos inducidos el agonista  $\mu$  fueron claramente diferentes, de forma que el compuesto indujo hipolocomoción y descenso de la postura erguida, así como un retraso en la aparición del primer desplazamiento en la prueba (Calenco-Choukroun y col. 1991). La actividad vertical, paralelamente a la locomoción horizontal, también parece tener mediación opioide (Ajayi y Ukponmwan 1994, Meyer y col. 1995a, Ukai y col. 1995). Existen evidencias de la participación del sistema opioide en las esterotipias, así se ha visto que la administración aguda o crónica de morfina produce esterotipias orales, que incluyen *masticación continuada* y *comportamiento roedor* (Pollock y Konetsky 1996, Wennemer y Konetsky 1996).

En cuanto a los efectos comportamentales inducidos por agonistas  $\delta$ , se ha observado que la administración de DTLET en el área tegmental ventral produjo hiperactividad locomotora en ratas sometidas a un ambiente familiar. En la prueba de campo abierto el agonista indujo hiperlocomoción horizontal asociada a un incremento de postura erguida. El agonista  $\delta$  BUBU produjo cambios similares. Asimismo, se observó que la administración del inhibidor del catabolismo de la encefalinas kelatorfan, produjo un fuerte

incremento en la locomoción y postura erguida, sugiriendo una actividad fásica del sistema encefalinérgico endógeno en el área tegmental ventral. La administración de los agonistas selectivos  $\delta$  DTLET y DSTBULET no afectó significativamente la actividad exploratoria de los animales en el tablero con agujeros. Ni la administración de agonistas  $\delta$ , ni la de inhibidores del catabolismo de las encefalinas produjeron modificaciones importantes en el comportamiento en el laberinto en cruz. Así, los agonistas  $\delta$  y las encefalinas endógenas no modificaron el estado emocional de los animales bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio (Calenco-Choukroun y col. 1991). Se ha sugerido que los componentes emocionales de la actividad motora estimulada por opioides estarían mediados más directamente por los receptores opioides  $\mu$  que por los  $\delta$  (Mickley y col. 1990). Otros autores han encontrado incrementos en la actividad locomotora lineal y efectos mixtos en el tiempo de estereotipias tras la administración i.c.v. del agonista  $\delta$  DPDPE en rata (Meyer y Meyer 1993a). La inyección bilateral i.c.v. del agonista selectivo  $\delta$  DPDPE en ratón C57BL/6J produjo hiperactividad locomotora horizontal (Mickley y col. 1990). Se ha encontrado que la administración del agonista selectivo  $\delta$  DPDPE en el núcleo de rafe medial incrementó la locomoción. Como ocurrió con el agonista  $\mu$  DAMGO, la administración de DPDPE se asoció con un incremento en el *turnover* de dopamina en el núcleo accumbens (Klitenick y Wirtshafter 1995). A diferencia del DAMGO, el DPDPE administrado en el núcleo accumbens no afectó la actividad motora (Johnson y col. 1995), sin embargo la administración intra-accumbens del agonista selectivo  $\delta_1$  p-CI-DPDPE produjo un efecto bifásico, atenuando inicialmente la locomoción y potenciándola después, y también se encontró un efecto bifásico de atenuación y posterior potenciación de la postura erguida (Meyer y col. 1995b). La inyección en ratas de los agonistas BW 373U86 y SNC 80 produjo incrementos dosis dependientes en la locomoción, postura erguida y movimientos estereotipados (lamidas, olisqueo y comportamiento roedor) (Spina y col. 1998), efectos producidos también tras la administración intra-accumbens del agonista natural (D-Ala<sup>2</sup>)-

---

deltorfina II (Longoni y col. 1991).

La administración de los agonistas selectivos  $\kappa$  U50,488 y CI-977 estimuló la actividad motora en ratas neonatales. En ratas adultas, sin embargo, agonistas  $\kappa$  suprimieron la locomoción (McLaughlin y col. 1995), o no la modificaron (Meyer y Meyer 1993a). Mientras unos autores encuentran que la microinyección de U50,488 en la sustancia gris periacueductal produjo efectos ansiogénicos en el laberinto en cruz (Motta y col. 1995), otros observan que la administración i.v. de U50,488 y U69,593 produjo un comportamiento de tipo ansiolítico en el mismo *test*, pero no influyó en la locomoción espontánea (Privette y Terrian 1995). El agonista  $\kappa$  DAKLI, provocó efectos mixtos sobre el tiempo de estereotipias pero no modificó la actividad locomotora, postura erguida y tigmotaxia en ratas (Meyer y Meyer 1993a).

Se pueden encontrar muchos trabajos acerca de los efectos comportamentales de los opioides en animales adultos, sin embargo hay pocos estudios de las respuestas comportamentales de animales neonatales a estos compuestos. Se ha observado que la morfina suprime la locomoción y la actividad general de los neonatos (Abbot y Guy 1995, Jackson y Kitchen 1989a), así como los comportamientos de olisqueo y los movimientos estereotipados realizados con la boca a los 10 y 20 días de edad (Jackson y Kitchen 1989a). La administración del agonista  $\mu$  DAGO produjo depresión comportamental similar a la producida por morfina (Jackson y Kitchen 1989a). La administración del agonista  $\delta$  DPDPE no produjo modificaciones comportamentales en ratas de 5, 10 y 20 días de edad (Jackson y Kitchen 1989a). En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, la administración de DPDPE (4mg/kg) a machos de 20 días de edad, provocó únicamente una modesta disminución en la deambulación externa de los animales en un campo abierto cuadrado (Viveros y col. 1997). El desarrollo retrasado del receptor  $\delta$  con respecto a los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  podría explicar los escasos o nulos efectos comportamentales de agonistas  $\delta$  encontrados en estos animales (Jackson y Kitchen

1989a, Kornblum y col. 1987, McDowell y Kitchen 1986, Petrillo y col 1987, Spain y col. 1985). En cuanto a los efectos comportamentales de agonistas  $\kappa$  en ratas neonatales, se ha visto que la administración de U 50,488H y PD 117,302 (1, 10 mg/kg) produjo una marcada hiperactividad, con incrementos en la locomoción en ratas de 5 y 10 días de edad. La administración de la dosis más alta de estos agonistas a animales de 20 días, produjo efectos sedantes y descensos significativos en el comportamiento roedor y *grooming*, mientras que no tuvo efectos significativos sobre la postura erguida (Jackson y Kitchen 1989a). El agonista U-50,488 produjo activación locomotora bloqueada por agonistas dopaminérgicos  $D_2$  y  $D_3$ , pero no  $D_1$ , en ratas de 17 días de edad (McDougall y col. 1997).

La administración de antagonistas opioides también revela resultados inconsistentes, lo que no aclara la posible implicación tónica del SOE en la regulación de la locomoción. Se ha visto que la administración de naltrexona (Balcells-Olivero y Vezina 1996, Kelley y col. 1996, Zhang y col. 1996) naloxona (Philopena y col. 1996), naloxonazina y  $\beta$ -funaltrexamina (Kelley y col. 1996), no modifica la locomoción. Sin embargo, en otros estudios se ha visto una atenuación de la actividad motora tras la administración de naloxona y naltrindol en el núcleo accumbens (Kelley y col. 1996), y una estimulación tras la inyección de naloxona en el núcleo septal medial (Mizuno y Kimura 1996). El antagonista opioide general e irreversible  $\beta$ -clornaltrexamina, redujo la actividad locomotora en ratón (Kozak y col. 1995). La hiperactividad inducida por anfetamina en roedores fue reducida por antagonistas opioides (Adams y col. 1981, Andrews y Holtzman 1987, Dettmar y col. 1978, Hitzemann y col. 1982, Hooks y col. 1992, Swerdlow y col. 1987),  $\delta$  (naltrindol),  $\delta_1$  (DALCE), y  $\delta_2$  (naltrindol isotiocianato, NTII) (Jones y col. 1993). El antagonista  $\mu$   $\beta$ -funaltrexamina, no modificó la actividad locomotora gruesa tras 24 y 48 horas de su administración, mientras que los antagonistas naloxona, naltrindol DALCE y NTII la redujeron (Ukai y Holtzman 1988). Algunos autores han encontrado que la administración central (i.c.v) de antagonistas selectivos  $\mu$  ( $\beta$ -funaltrexamina),  $\mu_1$  (naloxonazina),  $\kappa_1$ ,  $\delta_1$  (DALCE) y  $\delta_2$  (naltrindol

isotiocianato NTII) a ratas, redujeron significativamente la actividad total, ambulatoria y estereotipada durante el primer día tras la microinyección (Leventhal y col. 1996). La administración prenatal de naltrexona redujo la deambulaci3n, postura erguida, *grooming*, sacudidas y defecaci3n (McLaughlin y col. 1997). La administraci3n de naloxona redujo la motivaci3n investigadora y la actividad locomotora, sin afectar el *grooming* (Lukaszewska y Klepaczewska 1997). La administraci3n de inhibidores del catabolismo de las encefalinas produce activaci3n motora, lo que sugiere un control t3nico del comportamiento por parte del SOE (Churchill y col. 1998). De estudios realizados en ratones con una densidad de receptores  $\delta$  disminuida (*Knock-down* para dicho receptor), tambi3n se deduce que el sistema opioide end3geno  $\delta$  ejerce un control t3nico de la locomoci3n, ya que en estos ratones se observ3 una disminuci3n de la actividad locomotora desplegada en un ambiente novedoso para el animal (Negri y col. 1999). En general, parece por tanto, que los antagonistas opioides suprimen la actividad.

En estudios realizados con ratones *Knockout* para los receptores  $\mu$  o  $\kappa$ , as3 como para p3ptidos opioides (preproencefalina), se ha observado una alteraci3n del comportamiento espont3neo. Los ratones *Knockout*  $\mu$  (Matthes y col. 1996) y *Knockout* para el gen que codifica la preproencefalina (K3nig y col. 1996), presentaron una actividad locomotora disminuida, lo que sugiere una actividad t3nica en la modulaci3n de la locomoci3n (Kieffer 1999). Tambi3n parece que los ratones deficientes en prepro-encefalina presentan unos niveles de ansiedad incrementados, dado el comportamiento que exhiben en el campo abierto y en un laberinto elevado (K3nig y col. 1996). Los *Knockout*  $\kappa$ , no han mostrado un comportamiento diferente, en las condiciones estudiadas, a los ratones normales (Simonin y col. 1998).

Todos estos datos ponen de manifiesto la necesidad de aclarar el papel que juegan los opioides en la modulaci3n de las respuestas comportamentales. Como ya hemos comentado la mayor3a de los efectos comportamentales tras la administraci3n de agonistas

selectivos se han estudiado en animales adultos, mientras que se conoce poco acerca de dichos efectos en animales neonatales. En la presente Tesis Doctoral el estudio de las respuestas comportamentales tras la administración de agonistas  $\mu$  y  $\kappa$  a animales neonatales controles y tratados neonatalmente con naltrindol, pretende contribuir a la clarificación de efectos de agonistas opioides y de posibles interacciones entre diferentes tipos de receptores opioides en la modulación del comportamiento. Por otro lado, la implicación tónica del SOE tampoco está clara. En este trabajo, estudiaremos los efectos de la administración crónica neonatal de naltrindol así como de la administración aguda del antagonista, sobre las respuestas comportamentales desplegadas en el campo abierto por animales neonatales.

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, encontramos que un tratamiento crónico con el antagonista opioide de tipo general naltrexona durante el período predestete, producía importantes alteraciones en la conducta de los animales adultos, que se pusieron de manifiesto en diversas pruebas de comportamiento que permiten la evaluación de la actividad motora, capacidad exploratoria y ansiedad (De Cabo y col. 1995). Mediante la realización de una batería de pruebas similar en animales adultos tratados crónicamente con el antagonista selectivo  $\delta$  naltrindol durante el período neonatal o en la edad adulta, hemos pretendido aclarar la posible contribución del receptor  $\delta$  en el desarrollo y modulación de las respuestas comportamentales al estrés a largo y corto plazo.

#### I.4.2. RELACIONES DEL SOE CON SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS.

Muchos de los efectos producidos por los opioides endógenos y exógenos derivan de la modulación que ejercen estos compuestos sobre la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico. Esta modulación se produce tras la activación de receptores localizados en terminales axónicos (receptores presinápticos) o en los cuerpos

celulares y/o dendritas (receptores somatodendríticos). Existen receptores opioides localizados en neuronas que contienen monoaminas por todo el encéfalo. En particular, se han encontrado receptores opioides en neuronas dopaminérgicas estriatales cuyos cuerpos neuronales están localizados en el propio cuerpo estriado (Illes y Jackisch 1991, Murrin y col. 1980) o se encuentran en la sustancia nigra (Illes y Jackisch 1991, Murrin y col. 1980, Pollard y col. 1977).

Diversos estudios autorradiográficos y bioquímicos han demostrado la existencia de interacciones funcionales entre el SOE y sistemas monoaminérgicos centrales (Baron y col. 1985, Illes y Jackisch 1991, Piepponen y Ahtee 1995, Reid y col. 1988, Sharma y col. 1988, Vermeulen y col. 1995). Así, los niveles de  $\beta$  endorfina en el hipotálamo anterior y los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis, parecen estar regulados por la dopamina (DA) y serotonina (5-HT) (Forman y col. 1990), y se han encontrado interacciones entre el sistema opioide y el sistema dopaminérgico, tanto en el estriado (Di Chiara e Imperato 1988, Illes y Jackisch 1991, Jhamandas y Marien 1987, Kim y col. 1986, Reid y col. 1988) como en el hipotálamo (Illes y Jackisch 1991, Leadem y col. 1985, Wilkes y Yen 1980). En general, se ha visto que los opioides son capaces de inhibir el potencial de acción que conduce a la secreción de noradrenalina (NA), o DA en el SNC (Illes 1989, Jackisch y col. 1988, Langer 1981, Szekely y Romay 1982ab).

Algunos autores han encontrado un gran número de alteraciones en los niveles de los neurotransmisores NA, DA y 5-HT (Baron y col. 1985) y sus tasas de recambio (Sharma y col. 1988) tras el bloqueo crónico de los receptores opioides con el antagonista naltrexona. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la administración de naltrexona durante el período predestete, produjo en el animal adulto descensos significativos tanto en las concentraciones estriatales de 5-HT y su metabolito 5-HIAA, como en las hipotalámicas de 5-HT. Sin embargo, el tratamiento con el antagonista no tuvo efecto sobre el sistema serotoninérgico mesencefálico ni sobre el dopaminérgico estriatal (Viveros y col. 1995).

Con respecto a los estudios realizados en periodos tempranos del desarrollo, algunos autores han encontrado que la administración de morfina afecta al sistema dopaminérgico estriatal a la edad de 6 días (Roth y col. 1980). Sin embargo, otros han informado de la falta de efecto de la administración diaria de naloxona durante los 21 primeros días de vida, sobre las concentraciones de NA, DA y 5-HT en diversas áreas cerebrales de animales de 22 días de edad (Bardo y col. 1982). Nuestro grupo ha encontrado que la administración diaria de naltrexona durante el periodo predestete, induce alteraciones en los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos en ratas neonatales. La naltrexona afectó diferencialmente los dos sistemas monoaminérgicos dependiendo del área (estriado, mesencéfalo e hipotálamo) y de la edad (7, 14, 22 días) estudiadas (De Cabo y col. 1994).

Una serie de resultados indican que existe interacción a nivel comportamental entre la dopamina y los receptores opioides en el cerebro de mamíferos. Considerando el papel de los receptores dopaminérgicos en la farmacoterapia del Parkinson, estas interacciones podrían ser clínicamente relevantes (Vermeulen y col. 1995). Se ha observado que antagonistas dopaminérgicos, especialmente de los receptores D<sub>1</sub>, atenúan la estimulación comportamental producida por agonistas  $\delta$  (Longoni y col. 1991, Spina y col. 1998). Otros autores han encontrado que la administración crónica de antagonistas D<sub>1</sub> no altera la hiperlocomoción producida por la inyección del inhibidor del catabolismo de las encefalinas kelatorfan en el núcleo accumbens de ratas, sin embargo, antagonistas D<sub>2</sub> y no selectivos pero preferenciales de los D<sub>2</sub>, como el haloperidol, produjeron un incremento de este efecto (Maldonado y col. 1990). Otros autores encuentran que los antagonistas dopaminérgicos reducen significativamente, mientras que los agonistas incrementan, la activación motora producida por morfina en ratones (VanderWende y col. 1975). También se ha visto un aumento en la respuesta motora mediada por opioides endógenos tras lesiones dopaminérgicas en el núcleo accumbens, en las que están implicados receptores  $\mu$  y  $\delta$

(Churchill y col. 1998). Los efectos de los agonistas  $\delta$  sobre el metabolismo dopaminérgico dependen del sitio de administración. Así a dosis que producen preferencia de lugar, los agonistas  $\delta$  BW373U86 y SNC 80 no modificaron la dopamina extracelular del núcleo accumbens medial, mientras que redujeron la dopamina extracelular en el caudado putamen dorso-lateral (Longoni y col. 1998). También los efectos de los antagonistas dopaminérgicos sobre los efectos producidos por agonistas  $\delta$ , dependen de donde se administren éstos (Dauge y col. 1989).

Parece claro, por tanto, que el sistema opioide interacciona de forma importante con los sistemas monoaminérgicos, tanto en el animal adulto como en el neonato. La mayor parte de los trabajos en los que se ha bloqueado el sistema opioide para estudiar dichas interacciones, han utilizado antagonistas de carácter general, y se han realizado en animales adultos. En este trabajo, hemos estudiado las interacciones del sistema opioide con los sistemas dopaminérgicos y noradrenérgicos, en áreas donde estas interacciones tienen especial relevancia (hipotálamo, caudado putamen, sustancia nigra) y en animales neonatales. Dada la escasa información acerca de la implicación del receptor opioide  $\delta$  en estas interacciones durante el período neonatal, en este trabajo hemos estudiado los efectos de la administración crónica del antagonista selectivo  $\delta$  naltrindol durante el período predestete, sobre las concentraciones de NA, DA y DOPAC en las áreas mencionadas previamente, en animales de 20 y 25 días de ambos sexos. Conocida la participación del sistema dopaminérgico en los efectos comportamentales mediados por los receptores opioides, el estudio de la actividad desplegada por los animales tras este tratamiento, nos puede permitir asociar cambios en la actividad con modificaciones en los sistemas monoaminérgicos, particularmente en el sistema dopaminérgico. Trabajos previos de nuestro grupo utilizando el mismo tratamiento de naltrindol sugieren interacciones entre los receptores  $\delta$  opioide y  $\alpha_2$  adrenérgico (Alberti y col. 1999). Nos propusimos evaluar posibles efectos sobre otros componentes del sistema noradrenérgico, valorando niveles de NA.

## I.5. INFLUENCIA DEL SOE EN EL DESARROLLO SOMÁTICO.

El papel que puedan jugar los opioides sobre el desarrollo somático y neurobiológico reviste un especial interés, principalmente debido a la preocupación por las consecuencias del abuso de drogas opiáceas (y su terapia) en la madre gestante y/o lactante sobre el feto y neonato humanos (para revisión ver Harry y Rosecrans 1979, Zagon y McLaughlin 1992), así como por la implicación que parecen tener los opioides endógenos en los desórdenes caracterizados por el comportamiento impulsivo, deseo desmedido y pérdida de control como la bulimia, adicción a las drogas y alcoholismo (Jonas y Gold 1987, Reid 1990, Volpicelli y col. 1990).

Ya antes del descubrimiento de los péptidos endógenos, se observó que ratas inyectadas diariamente con morfina consumían comida vorazmente (Martin y col. 1963). Holtzman (1974, 1975) mostró que el antagonista naloxona suprimió la ingesta de comida y agua en ratas. Estudios posteriores han encontrado que los agonistas opioides aumentan la ingesta y los antagonistas opioides la disminuyen (Cooper y Kirkham 1993, Leibowitz 1985, Levine y col. 1985, Morley 1987, Sanger 1981). Aunque existe el acuerdo de que los opioides están involucrados en el comportamiento ingestivo, la naturaleza precisa de estas influencias aún no se ha determinado. Una hipótesis que ha recibido un apoyo considerable, sugiere que los opiáceos regulan específicamente la palatabilidad de la comida (Calcagnetti y Reid 1983, Cooper y Kirkham 1993).

Según los resultados disponibles, los péptidos opioides podrían ejercer un papel regulador del crecimiento por medio de mecanismos de inhibición. Su forma de actuación sería, además, a través de un *input* tónico (Zagon y McLaughlin 1992). Gran parte de los estudios se han realizado con agonistas y antagonistas opioides generales tales como la morfina, naloxona o naltrexona. En concreto, en lo que se refiere a los efectos de la administración repetida de antagonistas opioides durante el período predestete en ratas,

existe aún cierta controversia. Así, mientras que unos autores han encontrado que la administración crónica de una dosis alta de naltrexona (50 mg/kg) produce un incremento en el peso corporal y cerebral (Zagon y McLaughlin 1984), en otros trabajos en los que se utilizó la misma dosis del antagonista y la misma cepa de rata (Sprage-Dawley) no se encontraron efectos significativos sobre los mencionados parámetros (Petrie 1993). Además el tipo de efecto parece depender, entre otros factores, de la estirpe de ratas que se utilice. De hecho, el mismo protocolo mencionado anteriormente produjo disminución, en vez de aumento en los pesos cerebral y corporal de ratas Long-Evans (Petrie 1993). Con dosis más bajas de antagonistas (1mg/kg de naltrexona) se ha informado de un efecto reductor sobre el peso corporal (De Cabo y Viveros 1997, Zagon y McLaughlin 1984) y cerebral (Zagon y McLaughlin 1984) de los animales, o bien de la ausencia de efectos cuando se utilizaba la misma dosis (1mg/kg) de naloxona (Bardo y col. 1982), aunque en este último caso se encontró que una inyección diaria de morfina (5mg/kg) disminuyó el peso corporal y cerebral.

Es poco conocido el papel que juega el receptor  $\delta$  opioide en la ingesta. En la mayor parte de los trabajos que hemos encontrado, la administración de antagonistas  $\delta$  no modificó la ingesta de los animales (Arjune y col. 1991, Beczkowska y col. 1992, Bodnar y Geary 1991, Papadouka y Carr 1994). Sin embargo se ha observado que el naltrindol redujo la ingesta de sacarina (Beczkowska y col. 1993, Krishnan-Sarin y col. 1995) y el tratamiento crónico redujo la ganancia de peso en ratas con una dieta altamente sabrosa (Cole y col. 1995). Por otro lado Kelley y sus colaboradores (1996) han encontrado que la administración de naltrindol en el núcleo accumbens aumenta la ingesta en ratas. Mientras que los agonistas  $\mu$  parecen producir un efecto marcado sobre la ingesta, los agonistas  $\delta$  también la incrementan pero de forma más sutil (Bakshi y Kelley 1993).

Estos y otros resultados han llevado a cuestionar el papel del SOE en el crecimiento postnatal temprano y los mecanismos mediante los cuales, en su caso, los opioides

endógenos podrían estar implicados en su regulación (De Cabo y Viveros 1997, Petrie 1993, Zagon y McLaughlin 1992).

Dado que en el presente trabajo se ha empleado un tratamiento consistente en la administración diaria del antagonista  $\delta$  naltrindol durante las tres primeras semanas postnatales, pareció conveniente, a la vista de las razones expuestas, realizar un seguimiento de variables relacionadas con el desarrollo somático (peso corporal, tasa de crecimiento) durante la aplicación del tratamiento y, en su caso, posteriormente hasta la edad adulta. Igualmente, en animales que recibieron un tratamiento crónico con naltrindol (8 días) en edad adulta, se realizó un seguimiento del peso corporal durante el tratamiento. Estos datos nos van a permitir obtener una visión más global y contrastada de las consecuencias del tratamiento (Zagon y McLaughlin 1990, para discusión ver Wier y col. 1989) y pueden contribuir a clarificar el papel del receptor  $\delta$  opioide en el desarrollo somático.

## **II. ANTECEDENTES PRÓXIMOS DEL PRESENTE TRABAJO Y JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS.**

De todo lo expuesto en la Introducción de este trabajo puede deducirse, con carácter general, que dos aproximaciones al estudio de las implicaciones funcionales del SOE, utilizadas de forma complementaria, pueden ser particularmente útiles, a saber, la capacidad de agonistas opioides selectivos para modular farmacológicamente el comportamiento y la utilización de antagonistas específicos para determinados tipos de receptores en el análisis de su papel funcional. Además, es un hecho ampliamente demostrado que el SOE no trabaja aisladamente y que el estudio de sus interacciones con otros sistemas neuroendocrinos y neuroquímicos reviste un especial interés. La utilización de antagonistas opioides administrados de forma crónica, especialmente de antagonistas selectivos, resulta de gran utilidad para el estudio de la plasticidad del SOE, en particular durante el desarrollo temprano. Posiblemente una de las manifestaciones de dicha plasticidad sean las interacciones entre subsistemas (diversos tipos de receptores) opioides. La disponibilidad de nuevos compuestos selectivos opioides que pueden atravesar la barrera hematoencefálica brinda una herramienta útil desde el punto de vista experimental para una evaluación más rigurosa del papel de los distintos receptores. En el presente trabajo, que se inscribe dentro del contexto más amplio de un Proyecto Europeo sobre funciones del receptor  $\delta$  (EC BMH4-CT96-0510, DG 12-SSMA), se han tenido en cuenta todos estos aspectos.

A continuación se resumen algunos de los datos que más directamente nos han conducido a los objetivos de esta Tesis Doctoral.

En los últimos años se ha venido prestando un interés especial a la plasticidad del SOE. Numerosos trabajos han puesto de manifiesto que la administración crónica de agonistas y antagonistas opioides induce fenómenos de *down* (Rimanóczy y Vathy 1995, Tempel y col. 1988) y *up-regulation* (Bardo y col. 1982, 1983ab, Imai y col. 1994, Rothman y col. 1989) en los receptores opioides. Este tipo de estudios ha sugerido la existencia de

períodos críticos durante el desarrollo postnatal temprano del SOE, en los que dicho sistema sería particularmente sensible a tratamientos farmacológicos. En estos trabajos se han utilizado usualmente morfina o antagonistas generales no específicos como naloxona y naltrexona. La disponibilidad del naltrindol, antagonista altamente selectivo del receptor  $\delta$  de naturaleza no peptídica y capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Portoghese y col. 1988), resulta de especial utilidad en el estudio de las funciones del receptor  $\delta$ .

Existe abundante información en la literatura respecto a la existencia de interacciones funcionales y cooperatividad entre receptores  $\mu$  y  $\delta$  en roedores adultos. Este tipo de interacciones que afectan, entre otras, a respuestas antinociceptivas (Heyman y col. 1989ab, Kamei y col. 1992, Leander y col. 1988, Negri y col. 1995, Porreca y col. 1987b, Rothman y col. 1984), al desarrollo de dependencia física de morfina (Suzuki y col. 1995a) y a recompensa por estimulación cerebral (Duvauchelle y col. 1996), podrían tener implicaciones para la utilización terapéutica de opioides. Sin embargo, existen pocos datos hasta el momento acerca de estas interacciones funcionales durante el período neonatal. En trabajos previos inscritos dentro del Proyecto Europeo arriba indicado y realizados por nuestro grupo en ratas hembras, encontramos que el bloqueo funcional del receptor  $\delta$  mediante un tratamiento crónico con naltrindol durante el período predestete no afectó a la antinocicepción inducida por estrés (AIE) en ratas hembras de 20 días, una edad en la que la AIE fue mediada predominantemente por el receptor  $\mu$ . La ausencia de interacción entre receptores  $\mu$  y  $\delta$  a la edad de 20 días se vio confirmada por la falta de efecto del bloqueo funcional del receptor  $\delta$  sobre la respuesta antinociceptiva al agonista selectivo  $\mu$  alfentanil también en ratas hembras (Antelo y col. 1998). Debe tenerse en cuenta, sin embargo, la importante influencia que parece tener el sexo sobre la nocicepción y la modulación del dolor (Ali y col. 1995, Aloisi y col. 1994,1998, Bodnar y col. 1988, Cicero y col. 1996, 1997, Feine y col. 1991, Fillinging y Maixner 1995, Kepler y col. 1991, Mogil y Belknap 1997, Romero y col. 1988), así como la existencia de diferencias sexuales en cuanto al desarrollo

y densidad de receptores opioides (De Cabo y col. 1992a, Hammer 1990, Limonta y col. 1991, Rimanóczy y Vathy 1995), por lo que los resultados obtenidos en hembras no son extrapolables a machos. Por tanto, en la presente Tesis Doctoral, se diseñaron una serie de estudios en ratas macho de 20 días tratadas crónicamente con naltrindol y en las que a continuación se estudiaron diversas respuestas comportamentales y nociceptivas a agonistas selectivos  $\mu$  (alfentanil) y  $\kappa$ , (CI-977) con objeto de tener un cuadro más completo respecto a posibles interacciones funcionales entre tipos de receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  en la modulación de dichas respuestas. Diversos datos previos indican que las interacciones funcionales entre los receptores  $\mu/\delta$  en la modulación de la antinocicepción son complejas. Así, se ha visto que diferentes agonistas del receptor  $\delta$  modulan positivamente o negativamente la antinocicepción inducida por morfina (Heyman y col. 1989a) y que la modulación de la antinocicepción mediada por receptor  $\mu$  por parte de agonistas  $\delta$  también depende del agonista  $\mu$  específico empleado (Heyman y col. 1989b, Malmberg y Yaksh 1992, Traynor y Elliot 1993). Estos resultados han llevado a proponer que podrían existir diferentes subtipos de receptores  $\mu$  y  $\delta$  (formando un complejo o independientes) y que el subtipo de receptor  $\mu$  que supuestamente residiría en el complejo receptor  $\mu$ - $\delta$  podría ser selectivamente activado por ciertos agonistas  $\mu$ . Con objeto de profundizar en este aspecto, analizamos también las respuestas antinociceptivas a morfina en ratas neonatales de 20 días de ambos sexos tratadas crónicamente con naltrindol, y la comparación con los resultados obtenidos en el trabajo en el que se administró alfentanil (mencionado más arriba) ha proporcionado una indicación sobre la influencia potencial del agonista  $\mu$  empleado y del sexo sobre los efectos del tratamiento neonatal con naltrindol en respuestas antinociceptivas mediadas por el receptor  $\mu$ .

Diversos datos bibliográficos indican que la manipulación puede afectar a las respuestas antinociceptivas inducidas por compuestos tanto opioides como no opioides (Alberti y col. 1999, D'Amore y col. 1993). Sin embargo, la posible existencia de diferencias

sexuales a este respecto durante el período neonatal ha recibido menos atención. El tratamiento neonatal de tipo farmacológico que utilizamos en nuestros estudios supone una manipulación diaria de los animales. Así pues, se ha incluido en esta Tesis Doctoral un estudio acerca de los posibles efectos de la manipulación sobre respuestas antinociceptivas a morfina en ratas neonatales de ambos sexos.

Existen abundantes datos que indican que el SOE está implicado en la regulación del sistema HHA en mamíferos. Sin embargo, la naturaleza exacta de ese papel funcional es todavía objeto de controversia. Se ha observado que compuestos opioides pueden estimular o inhibir la actividad adrenocortical dependiendo de la especie, protocolo temporal de tratamiento, tipo de agente estresante y del tipo específico de receptor opioide activado (Bailey y Kitchen 1987, Degli Uberti y col. 1995, Gibson y col. 1979, Guaza y col. 1979, Hart y col. 1985, Kitchen y Rowan 1984). Ciertos datos han sugerido que son los receptores  $\mu$  más que los  $\delta$  los implicados en la modificación de las respuestas de corticosterona al estrés en ratas (Degli Uberti y col. 1995) y ratones (Hart y col. 1985, Kitchen y Rowan 1984) adultos. Sin embargo, se dispone de menos información acerca del tipo específico de receptor opioide implicado en la modulación de la respuesta adrenocortical al estrés en ratas neonatales. En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación encontramos que el bloqueo funcional del receptor  $\delta$  durante el período predestete, mediante la utilización de un tratamiento neonatal con naltrindol igual que el utilizado en esta Tesis Doctoral, producía en ratas hembras de 25 días de edad una inhibición de la respuesta de corticosterona al estrés de natación forzada. De nuevo, basándonos en datos previos que indican, por un lado la existencia de un dimorfismo sexual en la función del eje HHA (Viveros y col. 1988) y además la influencia de diferentes tipos de tratamientos neonatales en la maduración de dicho eje (Gray 1991), se realizaron estudios paralelos en ambos sexos con objeto de estudiar los efectos tanto del bloqueo funcional del receptor  $\delta$  como de la

manipulación que supone nuestro tratamiento neonatal, sobre la actividad adrenocortical durante el desarrollo.

Para este estudio se utilizaron machos y hembras de 25 días de edad respectivamente. Se eligió la edad de 25 días por ser este un período del desarrollo en el que presumiblemente se ha alcanzado una maduración suficiente del receptor  $\delta$  opioide (Kornblum y col. 1987, McDowell y Kitchen 1987) y se ha rebasado el período de hipoactividad adrenocortical en la rata (Bailey y Kitchen 1987, Sapolsky y Meaney 1986).

La mayoría de los estudios sobre interacciones entre receptores  $\mu$  y  $\delta$  en relación a la antinocicepción han utilizado como pruebas nociceptivas la inmersión de la cola en agua caliente y el *test* de *tail flick* (Heyman y col. 1989a, Kamei y col. 1992, Negri y col. 1995, Porreca y col. 1987b) que sólo permiten registrar respuestas que son esencialmente reflejos coordinados a nivel espinal y proporcionan poca información sobre el componente afectivo/emocional del dolor. Otras medidas como las respuestas de vocalización a la estimulación eléctrica de la cola son más informativas en ese aspecto (Millan 1990). De hecho, este *test* permite el estudio de diferentes reacciones al dolor integradas a diferentes niveles del sistema nervioso central (Borszcz 1995, Carrol y Lim 1960, Millan 1990, Naranjo y col. 1982, Noble y col. 1997, Pujol y col. 1993). Las propiedades de recompensa y la influencia positiva sobre el humor de los agonistas  $\mu$  podrían estar relacionadas con la capacidad de dichos fármacos de modificar respuestas emocionales asociadas con situaciones aversivas en ratas (Haney y Miczek 1994, Millan 1989). La implicación del receptor  $\delta$  y sus posibles interacciones con el receptor  $\mu$  en las respuestas afectivas al dolor son menos conocidas, aunque algunos datos sugieren un posible papel funcional para los receptores  $\delta$  en reacciones afectivas a estímulos aversivos (Haney y Miczek 1995). La combinación, en el diseño experimental de la parte correspondiente de esta Tesis Doctoral, del tratamiento crónico con naltrindol y el *test* de estimulación eléctrica de la cola para el estudio de respuestas antinociceptivas a morfina en ratas adultas, con especial interés en la

dimensión afectiva del dolor, supone una nueva aproximación al estudio de las interacciones  $\mu$ - $\delta$ . Por tratarse de un estudio en la edad adulta, se realizó sólo en machos, con objeto de evitar la mayor complejidad que hubiera supuesto la interferencia del ciclo estral de las hembras.

Existe cierta controversia respecto al posible control tónico que ejercen los opioides sobre la actividad motora. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indicaron, de forma indirecta, un posible efecto del naltrindol "*per se*" en la modulación de la actividad motora en animales neonatales (Viveros y col. 1997). Basándonos en estos estudios, en la presente Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos de la administración crónica y aguda de naltrindol sobre las respuestas comportamentales desplegadas por animales neonatales en un campo abierto (tablero sin agujeros). Además se han estudiado los posibles efectos de ambos tratamientos sobre la nocicepción. En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación encontramos que un tratamiento crónico con el antagonista opioide de tipo general naltrexona durante el período predestete producía importantes alteraciones en la conducta de los animales adultos que se pusieron de manifiesto en diversas pruebas de comportamiento que permiten la evaluación de actividad motora, capacidad exploratoria y ansiedad (De Cabo y col. 1995). Mediante la realización de una batería de pruebas similar en animales tratados crónicamente con el antagonista  $\delta$  selectivo naltrindol, hemos pretendido aclarar la posible contribución del receptor  $\delta$  en el desarrollo y modulación de respuestas comportamentales al estrés. Paralelamente, se estudiaron posibles alteraciones de la actividad adrenocortical en estos animales adultos que habían sido tratados crónicamente con el antagonista  $\delta$ . En el diseño de estos estudios se contemplaron posibles efectos del tratamiento crónico, tanto a largo como a corto plazo. Puesto que este estudio incluía la edad adulta, se realizó sólo en machos, con objeto de obviar posibles interacciones con el ciclo estral en las hembras.

Otros trabajos previos realizados en nuestro equipo mostraron que la administración

crónica del antagonista general naltrexona durante el período predestete producía diferentes modificaciones en sistemas monoaminérgicos encefálicos tanto durante el período neonatal (De Cabo y col. 1994) como a largo plazo en animales adultos (Viveros y col. 1995). Estos datos nos llevaron a hacer hincapié en las consecuencias de la plasticidad del SOE sobre el funcionamiento de sistemas neuroquímicos relacionados. Además, los cambios en sistemas monoaminérgicos observados en adultos (Viveros y col. 1995) parecían correlacionarse con las modificaciones comportamentales observadas también en los adultos tratados neonatalmente con naltrexona (De Cabo y col. 1995). En el presente trabajo hemos pretendido, mediante una aproximación análoga pero centrada en el receptor  $\delta$ , comprobar si el tratamiento neonatal con naltrindol podía producir algún cambio en sistemas catecolaminérgicos cerebrales y si estos posibles cambios podían correlacionarse con modificaciones comportamentales inducidas por naltrindol. Las medidas de catecolaminas se realizaron en animales neonatales, en los que el naltrindol produjo los efectos más marcados sobre la actividad motora. Se valoraron niveles de DA y DOPAC en caudado putamen y sustancia nigra por estar este sistema dopaminérgico estrechamente relacionado con el control motor. En nuestro anterior trabajo citado más arriba (De Cabo y col. 1994) y realizado en animales neonatales, observamos diferencias sexuales en el sistema dopaminérgico y también observamos que, tanto las diferencias sexuales como los efectos del tratamiento con naltrexona dependían de la edad de los animales. Aunque hemos encontrado relativamente pocos datos acerca de la influencia del sexo sobre el desarrollo de sistemas catecolaminérgicos, los trabajos de Siddiqui y colaboradores indican diferencias sexuales en contenido de DA y NA, en diferentes áreas cerebrales, particularmente en áreas claramente sexodimórficas como el hipotálamo y, de nuevo, en estos trabajos se apunta una influencia de la edad sobre estas diferencias sexuales (Siddiqui y Gilmore 1988, Siddiqui y Shah 1997). Teniendo en cuenta estos datos y considerando además que el destete parece ser crítico para el desarrollo del receptor  $\delta$  (Kitchen y col. 1995b), en este estudio se

incluyeron animales de ambos sexos de 20 (predestete) y 25 (postdestete) días de edad, y se valoraron además niveles de DA y NA en hipotálamo. Este diseño nos permitiría aclarar si los posibles efectos del tratamiento crónico con naltrindol dependían del desarrollo del receptor  $\delta$  y del sexo de los animales.

Como ya hemos indicado en la Introducción, los datos disponibles con respecto al papel del SOE en el desarrollo somático de la rata ponen de relieve tanto las discrepancias existentes hoy en día en la literatura como la utilización en la mayoría de este tipo de estudios de antagonistas generales (Bardo y col. 1982, De Cabo y Viveros 1997, Petrie 1993, Zagon y McLaughlin 1984). Respecto a este último hecho, la utilización de antagonistas no selectivos no permite dilucidar el papel concreto que, en su caso, podría jugar cada tipo específico de receptor. En vista de estos datos nos propusimos como un objetivo adicional de este trabajo evaluar los posibles efectos a corto y largo plazo de los tratamientos crónicos con naltrindol sobre la evolución ponderal de los animales.

### **III. OBJETIVOS**

En función de los datos arriba comentados, los objetivos principales de esta Tesis Doctoral pueden resumirse de la siguiente forma:

1.- ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE DIFERENTES TIPOS DE RECEPTORES OPIOIDES DURANTE EL PERÍODO NEONATAL. INFLUENCIA DEL SEXO Y DE LA MANIPULACIÓN.

*Con este propósito, se utilizó la siguiente aproximación experimental. Se analizaron los efectos del bloqueo funcional del receptor  $\delta$ , mediante un tratamiento crónico con el antagonista  $\delta$  selectivo naltrindol durante el período predestete sobre:*

*1.a) Respuestas comportamentales y nociceptivas al agonista  $\mu$  selectivo alfentanil y al agonista  $\kappa$  selectivo CI-977;*

*1.b) respuestas antinociceptivas a morfina;*

En el estudio correspondiente al apartado 1.a) se utilizaron machos de 20 días. Disponíamos de datos previos obtenidos por nuestro grupo de investigación respecto a interacciones entre diferentes tipos de receptores opioides en hembras (Antelo y col. 1998). Los resultados correspondientes al estudio del apartado 1.a) de esta Tesis han sido publicados recientemente en *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62: 145-149, 1999.

El estudio correspondiente al apartado 1.b) se realizó en machos y hembras predestete de 20 días de edad. Además se analizaron los efectos de la manipulación mediante la inclusión de grupos controles no manipulados. Los resultados correspondientes, aparecerán en breve recogidos en una publicación de un número especial sobre diferencias sexuales, en la revista *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (en prensa).

## 2.- IMPLICACIONES DEL RECEPTOR $\delta$ EN LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADRENOCORTICAL DURANTE EL PERÍODO NEONATAL. EFECTOS DEL SEXO Y DE LA MANIPULACIÓN.

*Con este propósito, se utilizó la siguiente aproximación experimental. Se analizaron los efectos del bloqueo funcional del receptor  $\delta$ , mediante un tratamiento crónico con el antagonista  $\delta$  selectivo naltrindol, y de la manipulación, durante el período predestete sobre niveles de corticosterona basales y en respuesta al estrés de natación forzada.*

Por las razones expuestas en la sección anterior se utilizaron en este estudio animales de 25 días de edad. Los datos obtenidos directamente en esta Tesis Doctoral son los referidos a tratamiento crónico con naltrindol en machos y efectos de la manipulación en ambos sexos. Los resultados sobre efectos del tratamiento crónico con naltrindol en hembras fueron parte de una Tesina presentada recientemente y realizada en el seno de nuestro grupo de investigación (Antelo 1998). Todos los datos correspondientes al estudio de efectos del bloqueo funcional del receptor  $\delta$  y de la manipulación sobre actividad adrenocortical en ratas de ambos sexos han sido publicados en conjunto en *Dev. Brain Res.* 112: 135-137, 1999.

## 3.- ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE RECEPTORES $\mu$ - $\delta$ , CON ESPECIAL ATENCIÓN A LA DIMENSIÓN AFECTIVA DEL DOLOR, EN ANIMALES ADULTOS.

*Con este propósito, se utilizó la siguiente aproximación experimental. Se analizaron los efectos del bloqueo funcional del receptor  $\delta$ , mediante un tratamiento crónico con el*

*antagonista  $\delta$  selectivo naltrindol sobre respuestas antinociceptivas a morfina en el test de estimulación eléctrica de la cola en ratas macho adultas.*

Los resultados de este estudio han sido publicados en *Neurosci. Lett.* 260: 81-84, 1999.

#### 4.- ESTUDIO SOBRE IMPLICACIONES FUNCIONALES DEL RECEPTOR $\delta$ EN EL DESARROLLO Y MODULACIÓN DE RESPUESTAS COMPORTAMENTALES Y FISIOLÓGICAS AL ESTRÉS. CORRELACIONES NEUROQUÍMICAS.

*Con este propósito, se utilizó la siguiente aproximación experimental. Se analizaron los efectos de tratamientos crónicos y agudos con naltrindol sobre la actividad y nocicepción en ratas macho neonatales. También se analizaron los efectos a corto y largo plazo del bloqueo funcional del receptor  $\delta$ , mediante tratamientos crónicos con el antagonista  $\delta$  selectivo naltrindol sobre comportamiento y actividad adrenocortical en ratas macho adultas. Además, se evaluaron los posibles efectos del tratamiento crónico neonatal con naltrindol sobre sistemas noradrenérgicos y dopaminérgicos en diversas áreas cerebrales (caudado putamen, hipotálamo y sustancia nigra) de animales de ambos sexos de 20 y 25 días de edad.*

Los resultados más interesantes de este estudio están incluidos en una publicación en preparación.

5.- EVALUAR LOS POSIBLES EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DEL ANTAGONISTA SELECTIVO  $\delta$  NALTRINDOL SOBRE LA EVOLUCIÓN PONDERAL DE LOS ANIMALES TANTO DURANTE EL PERÍODO DE TRATAMIENTO (DÍAS 0-19) COMO DURANTE ETAPAS POSTERIORES HASTA LA EDAD ADULTA.

De esta forma, pretendimos obtener información adicional sobre el posible papel del receptor  $\delta$  en el desarrollo somático y sobre las posibles repercusiones del tratamiento neonatal a largo plazo.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### IV.1. ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Los animales utilizados en esta Tesis Doctoral fueron ratas (*Ratus norvegicus*) albinas, de la variedad Wistar y de la cepa CFHD procedente de la casa comercial Harlan Interfauna Ibérica. La cría y mantenimiento tuvo lugar en el Animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Las condiciones ambientales del estabulario se mantuvieron constantes: una temperatura  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa de  $50\pm 1\%$  y un fotoperíodo invertido de 12 h. oscuridad (luz roja)/ luz blanca, comenzando la fase lumínica a las 20.00 h. El fotoperíodo invertido nos ha permitido realizar los estudios antinociceptivos y comportamentales y aplicar los tratamientos farmacológicos durante la fase oscura, en la cual los animales despliegan mayor actividad y en la que se ha visto que tanto los péptidos opioides como sus receptores muestran un pico circadiano en el cerebro (Giardino y col. 1990, Trentini y col. 1991). El trabajo experimental se realizó entre las 9.00 h. y las 15.30 h.

Los animales en todo momento tuvieron libre acceso a la comida y bebida. El pienso utilizado para el mantenimiento de los animales fue el A04 (Panlab) y para crías de 0-42 días y hembras gestantes y lactantes se utilizó el A03, que estaba enriquecido en vitaminas y proteínas. Los animales se alojaron en jaulas de material plástico de dos tamaños: pequeñas ( $500\text{ cm}^2$ ) en las que se alojaron las hembras en período de gestación y las crías hasta la edad de 15 días, y grandes ( $1000\text{ cm}^2$ ) para camadas de crías de más de 15 días y a partir del destete hasta la edad adulta. Las jaulas se cerraron por una rejilla metálica que contenía el alimento y un biberón con agua y el suelo se cubrió con viruta higienizada. Los animales adultos se alojaron en jaulas grandes en grupos de 4-6 individuos del mismo sexo.

Todos los animales utilizados en este trabajo, excepto los estudiados únicamente en edad adulta, nacieron de cruzamientos estandarizados de machos de edades comprendidas entre 2,5-4 meses, con hembras nulíparas de aproximadamente 2,5-3 meses. Para la

realización de los cruzamientos se alojaron dos hembras con un macho en una jaula grande y se mantuvieron juntos períodos de 5 días, la duración aproximada del ciclo estral. Diariamente, a las 5 de la tarde, se realizaron frotis vaginales a las hembras y las muestras obtenidas fueron observadas al microscopio. El día que se visualizaron espermatozoides fue considerado día uno de gestación y la hembra gestante fue aislada en una jaula pequeña y vigilada hasta el parto, que tendría lugar entre los días 22-23 de gestación.

El día de nacimiento de las crías fue considerado día cero de edad. El destete se llevó a cabo el día 22 de edad procediéndose al alojamiento de los animales en número de  $5 \pm 1$  individuos del mismo sexo.

El día del parto las camadas se homogeneizaron tanto en número de crías ( $10 \pm 1$ ), proporción de sexos ( $5 \pm 1$ ) como en peso de los neonatos (4,5-6 g). Todo esto se hizo con el fin de minimizar las posibles diferencias comportamentales y neurofisiológicas que pudieran derivarse de camadas con distinto número de animales, diferente proporción sexual y/o crías de pesos corporales muy dispares debido a distintas condiciones nutricionales (De Cabo y col. 1993, Patia Spear y col. 1996). Se realizó intercambio de animales entre camadas (*cross fostering*) sólo cuando fue estrictamente necesario.

Con el fin de identificar cada animal, se realizaron tatuajes subcutáneos mediante la inyección de una pequeña cantidad de tinta china en las distintas patas. Este tatuaje permanecía hasta la edad adulta.

## **IV.2. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS CRÓNICOS**

### **IV.2.1. TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL DURANTE EL PERÍODO NEONATAL.**

El fármaco utilizado para realizar este tratamiento fue el antagonista opioide naltrindol (NTI). El naltrindol -17- ciclopropilmetil- 6,7- dehidro- 4,5 $\alpha$ -epoxi- 3,14- dihidroxi- 6,7,2',3'

indolomorfinan- es un compuesto de naturaleza no peptídica, con alta potencia y alta selectividad como antagonista del receptor  $\delta$  opioide (Contreras y col. 1993, Portoghese y col. 1988, Takemori y col. 1992). Fue el primer compuesto no peptídico que se encontró como antagonista del receptor  $\delta$ . Por su naturaleza ofrece una gran ventaja, y es que atraviesa barrera hematoencefálica, lo que resulta importante sobre todo si se trabaja con animales adultos en los que la administración resulta mucho más cómoda. Este compuesto es, por lo tanto, un instrumento muy útil en investigación sobre opioides.

Desde el día de nacimiento (día 0 de edad) hasta el día 19 de edad, ambos inclusive, aproximadamente la mitad de los animales de cada sexo dentro de cada camada, recibieron diariamente una inyección s.c. de NTI en su forma hidrociorada (RBI) 1mg/kg, 1ml/kg, y la otra mitad una inyección s.c. con un volumen equivalente de suero salino (SS) 0.9%. Es decir, se procedió de manera que una misma camada tuviera, aproximadamente, la mitad de machos y hembras inyectados con SS y la otra mitad inyectados con NTI. A esta dosis, el NTI antagoniza selectivamente los receptores  $\delta$  sin tener efecto sobre los  $\mu$  (Crook y col. 1992, Kitchen y Pinker 1990, Muhammad y Kitchen 1993a). Se eligió este período para el tratamiento, porque el SOE parece presentar una plasticidad única y una especial sensibilidad a diversos tratamientos, incluidos los farmacológicos, durante esta etapa temprana en que los receptores opioides se encuentran en rápido desarrollo (Bardo y col. 1983b, De Cabo y col. 1992a, 1993, 1995, Imai y col. 1994, Rimanóczy y Vathy 1995, Rothman y col. 1989, Tempel y col. 1988, Zadina y Kastin 1986).

Los animales fueron pesados diariamente para registrar su evolución ponderal durante el tratamiento y con el fin de calcular con exactitud el volumen de inyección. La administración del tratamiento fue realizada mediante inyección subcutánea en el lomo, con una aguja (Becton Dickinson 30 g), ajustada a una jeringa Hamilton de 100  $\mu$ l acoplada a un soporte que facilitaba la administración. De la aplicación de este tratamiento siempre se ocuparon dos

personas, una encargada de la sujeción del animal y otra de la inyección del volumen de SS o NTI correspondiente.

La obtención de los pesos corporales y la inyección de los animales hasta el día 19 de edad, se realizó siempre en una habitación en luz blanca para facilitar el trabajo, insonorizada frente al exterior con doble puerta, sin ventanas y con una fuente de ruido continuo y monótono para amortiguar los que pudieran producirse durante la experimentación (o posibles filtraciones del exterior) y que pudieran alterar a los animales. Se ha señalado en diversos estudios que, durante el período perinatal, incluso una manipulación suave puede producir por sí misma reacciones de estrés tales como la estimulación aguda de las glándulas adrenales y cambios en las respuestas emocionales (para revisión ver Denenberg y Zarrow 1971, Gray 1991). A lo largo de todo el trabajo experimental la manipulación de los animales se realizó de una forma sistemática y delicada.

A pesar de que, como ya se ha expuesto, en algunos estudios de esta Tesis Doctoral sólo se utilizaron machos, el tratamiento neonatal fue aplicado tanto a machos como a hembras en todos los casos.

#### IV.2.2. TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL DURANTE LA EDAD ADULTA.

Este tratamiento fue empleado para estudiar el efecto del bloqueo funcional del receptor  $\delta$  cuando éste se encuentra totalmente desarrollado. Como ya hemos mencionado los adultos se alojaron en grupos de 4-6 individuos por jaula. La mitad de los animales de cada jaula recibieron una inyección diaria de NTI (1mg/kg, 1ml/kg) durante 8 días consecutivos y la otra mitad una inyección de SS 0.9% en el mismo volumen.

### IV.3. PRUEBAS NOCICEPTIVAS

#### IV.3.1. PRUEBA DE INMERSIÓN DE LA COLA EN AGUA CALIENTE (I.C.).

Esta prueba se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Janssen y colaboradores (Janssen y col. 1963) y que posteriormente adaptaron a ratas jóvenes Kitchen y sus colaboradores (Kitchen y col. 1984). Se toma el animal cruzando sus patas delanteras y manteniéndole en posición vertical. En el momento en que relaja la cola se sumerge aproximadamente el último tercio de ésta (por ser la zona más sensible) en agua a 50 °C, temperatura que se mantiene constante mediante un termostato. En anteriores trabajos, nuestro grupo de investigación comprobó que esta temperatura era la apropiada para registrar latencias en animales neonatales de 20 días, así como en animales adultos (De Cabo y col. 1992b). Con un cronómetro manual se registra la latencia, definida como el tiempo que transcurre entre la inmersión de la cola en el agua y el momento en que el animal la retira, que corresponde al momento en que la cola corta la superficie del agua.

La retirada de la cola del estímulo térmico responde a procesos fisiológicos que ocurren principalmente a nivel de la médula espinal, por lo que una latencia de retirada de la cola incrementada se considera indicativa de analgesia espinal (Kieffer 1999).

Para valorar la antinocicepción producida por un fármaco, en primer lugar se toma la latencia basal (pre-tratamiento), a continuación se administra el fármaco, y transcurrido el tiempo elegido se realiza de nuevo el *test* para obtener la latencia final (post-tratamiento). Para cuantificar la antinocicepción, hemos utilizado el cociente de latencias (Alberti y col. 1999, Antelo y col. 1998, Pujol y col. 1993), obtenido aplicando la siguiente fórmula:

Cociente de latencias: latencia final / latencia basal

En esta prueba, como en todas las pruebas para la valoración de la antinocicepción se establece un punto de corte o *cut-off*. En este caso el *cut-off* establecido fue de 10 segundos. Si transcurrido este tiempo el animal no responde al estímulo se da por finalizada la prueba con el fin de evitar posibles lesiones en la cola del animal.

#### IV.3.2. PRUEBA DE ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE LA COLA (EEC).

Esta prueba se utiliza para determinar el umbral de tolerancia de un animal a un choque eléctrico. Para ello basta con aplicarle a través de unos electrodos una corriente cuyo valor se incrementa con el tiempo. Cuando se detecta en el animal la respuesta deseada se registra el valor de la intensidad que la ha ocasionado. Para llevar a cabo esta prueba los estímulos deben aplicarse con una determinada duración, a unos intervalos determinados, y los incrementos de corriente deben ser constantes y repetitivos, si se pretende comparar diferentes experimentos.

El aparato consiste en un chocador programable SH-92 (Cibertec) que deja al observador la tarea de determinar el momento en que la respuesta del animal es la deseada y leer a qué intensidad de corriente se ha producido. Básicamente se compone de un generador de pulsos de corriente de frecuencia ajustable (20-99 Hz), de un generador de trenes de pulsos cuyo intervalo (1-9,9 s) y duración (100-990 ms) se pueden también programar, y de una fuente de corriente constante que varía de forma automática su valor a través del tiempo.

El *test* de estimulación eléctrica de la cola permite la evaluación de tres respuestas nociceptivas relacionadas con sistemas de regulación del dolor existentes en el sistema nervioso central a diferentes niveles. Así se registra la respuesta motora (M), que se pone en evidencia por la retirada de la cola durante el estímulo eléctrico, la vocalización durante la descarga (VDD) y la vocalización post-descarga (VPD). Se considera que estas respuestas están integradas a nivel espinal, bulbar y nivel diencefalo-rinencefalo (sistema límbico)

respectivamente (Borszcz 1995, Carrol y Lim 1960, Millan 1990, Naranjo y col. 1982, Noble y col. 1997).

Se realiza introduciendo al animal en un cepo de PVC que le mantiene inmovilizado, y en el que la cola queda al descubierto. Sobre ella se ajustan dos electrodos en forma de pinza, bajo los que se aplica un gel conductor de la electricidad y a través de los cuales se recibe el estímulo eléctrico. Uno de ellos se coloca aproximadamente a 2 cm. de la base de la cola, y el otro a 4 cm. Es conveniente habituar a los animales al cepo unos días antes de someterles al *test*, con el fin de minimizar el estrés producido por el mismo. En nuestro caso todos los animales fueron introducidos en el cepo durante unos segundos los 3 días previos a la realización de la prueba.

Los valores de los parámetros elegidos para este *test*, en base a trabajos previos realizado por nuestro grupo (Pujol y col. 1993, Viveros y col. 1993) y numerosas pruebas que se realizaron antes de comenzar los presentes experimentos, fueron los siguientes:

- Incremento de intensidad entre trenes: 0.06 mA
- Intensidad máxima aplicada: 7.62 mA. Si el animal no responde a esta intensidad de corriente la prueba se da por finalizada y se considera que el animal ha alcanzado el *cut off* o punto de corte.
- Duración del tren: 100 ms
- Número total de trenes seleccionados: 128
- Intervalo entre trenes: 5 s
- Frecuencia de pulso: 60 Hz

De esta manera, el estimulador aplica descargas eléctricas crecientes sobre la cola del animal, y éste presenta las tres respuestas anteriormente mencionadas a una intensidad de estímulo determinada, que es el dato que se registra.

Los datos se transforman en porcentajes del efecto máximo posible (MPE). Estos porcentajes se calculan según la fórmula:

$$\text{MPE} = (\text{latencia final} - \text{latencia basal} / \text{cut off} - \text{basal}) \times 100$$

Así los animales que alcancen el *cut off*, se considera que presentan un 100% de antinocicepción. Pueden resultar valores de MPE negativos cuando ocurra que la respuesta final se produzca a una intensidad menor que respuesta basal.

#### IV.4. PRUEBAS COMPORTAMENTALES.

Para la realización de las pruebas comportamentales de este trabajo, se utilizaron una serie de aparatos en los que valoramos una amplia variedad de parámetros comportamentales, referentes a la actividad locomotora y exploratoria, emotividad y ansiedad de los animales. Nuestro modelo de análisis comportamental ha utilizado paradigmas que se entiende implican novedad/incertidumbre (tablero con agujeros) (Kshama y col. 1990), aversión (campo abierto o tablero sin agujeros) (Gray 1991, Gray y col. 1975) y conflicto de aproximación-evitación (laberinto en cruz) (Pellow y col. 1985, Pellow y File 1986).

##### IV.4.1. TABLERO DE AGUJEROS.

Consiste en un prisma cuadrangular, descubierto, de 45 cm de altura y base cuadrada de 60 cm de lado. Las paredes del aparato son metálicas y están pintadas de verde claro mate. El suelo del aparato, del mismo color, está dividido por líneas trazadas en color rojo en 36 cuadrados de 10 cm de lado cada uno. En la zona central del aparato se encuentran 4 agujeros equidistantes de 3,8 cm de diámetro, situados de manera que dibujan una zona central formada por 4 cuadrados.

Esta prueba tuvo una duración de 5 minutos (De Cabo y col. 1995, File y Wardill 1975, Viveros y col. 1996), se desarrolló bajo condiciones de iluminación roja, y fue realizada por el animal una sola vez. En este *test* se ha valorado de forma separada el recorrido que el animal realiza al desplazarse por los recuadros situados junto a las paredes del aparato (deambulaci3n externa) y el desplazamiento en la zona central alrededor de los agujeros (deambulaci3n interna). Se hizo as3 para no perder de vista el distinto componente emocional que puede tener para la rata - animal de clara tendencia tigmot3xica (Barnett 1966, Grossen y Kelley 1972) - el desplazarse junto a la pared y las esquinas del aparato, frente a adentrarse en la zona central del mismo.

La sesi3n comienza con el animal situado en una de las esquinas del aparato, siempre la misma, por ser 3sta una zona neutra desde el punto de vista comportamental. Esto se hizo as3 con el fin de que el animal no se viera abocado artificialmente a realizar ninguna pauta en particular, especialmente ninguna que se pudiera considerar exploratoria o investigadora. Sobre un esquema del suelo del aparato en papel y mediante la observaci3n directa de la prueba, se va dibujando la trayectoria seguida por la rata. Esta forma de medici3n ya ha sido empleada anteriormente (Blizard y col. 1975, De Cabo y col. 1995, Viveros y col. 1996). Posteriormente se contabilizan las veces que la rata pasa por los distintos cuadrantes.

Las variables que se midieron a lo largo de la prueba mediante observaci3n directa fueron las siguientes: deambulaci3n externa (DE), deambulaci3n interna (DI), frecuencia de exploraci3n de agujeros (F. EXP), tiempo de exploraci3n de agujeros (TPO. EXP.), postura erguida (PE), tasa de defecaci3n (DEF) y atusamiento rostral o *grooming* facial (G).

Para evaluar dichos par3metros se siguieron los siguientes criterios:

- La deambulaci3n externa se mide contabilizando el n3mero de veces que el animal entra en los cuadrantes que contactan con las paredes del aparato. Se consider3 que el animal entr3 en un cuadrado cuando pas3 a 3l con las patas delanteras y la cabeza.

- La deambulaci3n interna se mide contabilizando el n3mero de veces que el animal entra en los cuadrantes que no est3n en contacto con las paredes del aparato.
- La deambulaci3n total corresponde a la suma de la deambulaci3n externa e interna.
- La frecuencia de exploraci3n de agujeros se define como el n3mero de veces que el animal introduce el hocico o la cabeza en el interior de alg3n agujero para explorarlo. Se ha sugerido que este par3metro podr3a representar la exploraci3n inquisitiva del animal (Robbins 1977).
- El tiempo de exploraci3n se define como el tiempo en segundos que el animal invierte explorando agujeros. Este par3metro es un reflejo de la exploraci3n inspectiva del animal (Robbins 1977).
- La tasa de postura erguida se obtiene contando el n3mero de veces que el animal se eleva sobre sus patas traseras, con independencia de la zona del recinto en que se produzca esta pauta.
- Para valorar el atusamiento rostral o *grooming* facial se contabiliza el n3mero de veces que la rata se frota la cabeza y el rostro con las patas delanteras.
- La tasa de defecaci3n se valora contabilizando el n3mero de bolas fecales que el animal deja sobre la superficie del aparato al finalizar la prueba.

Los par3metros de exploraci3n de agujeros y el tiempo de exploraci3n son distintivos de esta prueba y se consideran par3metros de exploraci3n dirigida hacia un est3mulo (Kshama y col. 1990, Lister 1987, Pellow y col. 1985, Steenbergen y col. 1991, Wilson y col. 1991). La exploraci3n de los agujeros es un comportamiento espont3neo desplegado por la rata y es muy sensible a los efectos de distintas drogas y a la repetic3n de la prueba, ya que se ha demostrado la existencia de habituaci3n en este comportamiento (File 1978ab). La frecuencia de exploraci3n de agujeros es un par3metro que mide la actividad exploratoria del animal, independientemente de su actividad motora (File y Wardill 1975).

Hemos atribuido un valor exploratorio al desplazamiento por la zona central, alrededor de los agujeros/estímulo, si bien no podríamos descartar, *a priori*, que indique también una menor emotividad, dado que la rata es un animal tigmotáxico. La deambulación externa, por la periferia del recinto y junto a la pared, sería un parámetro de locomoción. La postura erguida normalmente es considerada un parámetro de valor exploratorio en diversas observaciones comportamentales (Kovács y De Wied 1978, Gray 1991, Meyerson y col. 1988), pero en esta prueba se considera un parámetro de actividad general, o en todo caso de exploración inespecífica, por contraposición a la exploración dirigida, representada en la exploración de los agujeros/estímulo; en este sentido apuntan los distintos trabajos que emplean esta prueba (De Cabo y col. 1995, File y Wardil 1975, Steenbergen y col. 1991, Viveros y col. 1996, Wilson y col. 1991).

Una tasa de defecación incrementada tiene un reconocido valor de mayor emotividad (Beatty 1979, Blizard y col. 1975, Gray 1991, Gray y Lalljee 1974, Gray y col. 1965, 1969, 1975). Sin embargo, no debe descartarse *a priori* que ciertas modificaciones en este parámetro puedan deberse a posibles efectos de fármacos sobre el sistema gastrointestinal (Viveros y col. 1996).

El *grooming* es un parámetro considerado, en general, indicativo de reactividad al estrés, de un índice de emotividad aumentado (Bardo y col. 1989, Drago y Genazzani 1991, Gray 1991, Gray y col. 1965, Stone 1978). Para algunos investigadores, esta pauta es considerada como una actividad de desviación, es decir, respondería a una forma de liberar la tensión surgida ante una situación de estrés (Albonetti y Farabollini 1992, Drago y Genazzani 1991, Gray 1991).

#### IV.4.2. CAMPO ABIERTO (TABLERO SIN AGUJEROS).

El recinto se diseñó siguiendo el modelo descrito por File y Wardill en 1975, para el tablero con agujeros. Es una réplica del mismo, la única diferencia es que el suelo de este aparato no contiene agujeros.

Esta prueba tuvo una duración de 5 minutos, y se desarrolló bajo condiciones de iluminación de luz roja. La sesión comienza con el animal situado en una esquina prefijada del aparato. De la misma forma que en el tablero con agujeros, sobre un esquema del suelo del aparato sobre el papel y mediante la observación directa de la prueba, se va dibujando la trayectoria seguida por la rata. Siguiendo los mismos criterios explicados anteriormente se valoran la deambulación externa, la deambulación interna, postura erguida, el *grooming* facial y la tasa de defecación.

La mayoría de los parámetros medidos en esta prueba se interpretan de la misma forma que en el tablero con agujeros. Sin embargo en este aparato, al no existir agujeros, la postura erguida se considera un índice de actividad exploratoria y un aumento en la deambulación interna es más claramente indicativo de un menor nivel de emotividad del animal (Albonetti y Farabollini 1992).

#### IV.4.3. LABERINTO EN CRUZ.

El laberinto en cruz está compuesto por dos brazos abiertos de 50 cm de longitud, 10 cm de ancho y paredes de 40 cm de altura y dos cerrados, de las mismas dimensiones, dispuestos de manera que los brazos del mismo tipo están uno en frente del otro. La confluencia de los cuatro brazos da lugar a una zona central neutra cuadrada de 10 cm de lado. El aparato está construido con un material plástico rígido de color verde claro mate y está elevado del suelo 62 cm por un soporte metálico que consta de ocho patas.

La duración de la prueba fue de 5 minutos (De Cabo y col. 1995, Wilson y col. 1991) y se realizó en luz roja. La duración se escogió basándonos en el hecho de que el comportamiento de aversión es particularmente marcado durante este tiempo pero comienza a disminuir al final de un período de 10 minutos (Montgomery 1958).

La prueba comienza situando el animal en la zona central neutra del aparato mirando hacia un brazo abierto. Se considera que el animal está en uno de los brazos cuando mantiene sus cuatro patas dentro de él y, por tanto, sale del brazo cuando, al menos, saca una de las patas (Pellow y col. 1985).

Los parámetros que se contabilizaron para esta prueba fueron los siguientes:

- Número de entradas a los brazos abiertos (Eba): número de veces que el animal entra en cualquiera de los dos brazos abiertos.
- Tiempo en brazos abiertos (Tba): tiempo en segundos que el animal permanece en los brazos abiertos.
- Número de entradas a los brazos cerrados (Ebc): número de veces que el animal entra en alguno de los dos brazos cerrados.
- Tiempo en los brazos cerrados (Tbc): tiempo en segundos que el animal permanece en los brazos cerrados.
- Número de entradas totales (Etot): número de veces que el animal entra en alguno de los brazos (Eba + Ebc).
- Tiempo total en los brazos (Ttot): tiempo que el animal ha pasado explorando cualquiera de los brazos (Tba + Tbc).

Asimismo se calcularon las siguientes variables:

- Porcentaje de entradas a los brazos abiertos (% Eba/Etot): representa el número de entradas en los brazos abiertos, frente al número total de entradas realizadas en cualquier tipo de brazo.

- Porcentaje de entradas a los brazos cerrados (% Ebc/Etot): representa el número de entradas en los brazos cerrados, frente al número total de entradas realizadas en cualquier tipo de brazo.
- Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (% Tba/Ttot): representa el tiempo pasado en los brazos abiertos, frente al tiempo total explorando cualquier tipo de brazo.
- Porcentaje de tiempo en los brazos cerrados (% Tbc/Ttot): representa el tiempo pasado en los brazos cerrados, frente al tiempo total explorando cualquier tipo de brazos.

Esta prueba se considera idónea para la identificación selectiva de drogas de efectos ansiolíticos o ansiogénicos, ya que existen evidencias fisiológicas y comportamentales que demuestran que la tendencia de los animales a evitar los brazos abiertos está motivada por el miedo y la ansiedad (Pellow y col. 1985, Pellow y File 1986). El número total de entradas a brazos y la frecuencia de visitas a brazos cerrados están relacionados básicamente con la actividad general del animal (File 1992, Graeff y col. 1990, Johnston y File 1991, Pellow y col. 1985, Wilson y col. 1991).

Los tres aparatos descritos se limpiaron al finalizar la prueba con cada animal, para evitar posibles interferencias debidas al rastro dejado por cada individuo.

#### **IV.5. VALORACION DE CORTICOSTERONA.**

##### **IV.5.1. RECOGIDA DE MUESTRAS.**

Las muestras de sangre se tomaron por decapitación en animales de 25 días donde ya se ha superado el período hipoactivo (Bailey y Kitchen 1987, Sapolsky y Meaney 1986) y en edad adulta, alrededor de 150 días de edad. Para el establecimiento del horario en que se

recogían las muestras, tuvimos en cuenta el ritmo circadiano de la corticosterona, con el fin de obtenerlas en un momento adecuado del fotoperíodo. En este sentido, el nivel de corticosterona de la rata se incrementa durante el período de luz y alcanza un valor máximo al comienzo del período de oscuridad. A partir de este momento, dicho nivel decrece lentamente hasta alcanzar un valor mínimo cerca del comienzo del siguiente período de luz, cerrándose así el ciclo. En nuestro trabajo se eligió entre la cuarta-quinta hora (12.30 h.) después del comienzo de la fase de luz roja en el estabulario, momento que equivale a un valor medio y relativamente estable dentro del ritmo circadiano de la hormona (Ahlers y col. 1980, Viveros y col. 1988). Según esto, los animales fueron decapitados durante el período comprendido entre las 12.30-13.30 h.

Una vez obtenidas las muestras, se mantuvieron durante 2-3 horas a temperatura ambiente no superior a 25°C, tiempo suficiente para la coagulación de la sangre. A continuación fueron centrifugadas (3000 r.p.m., 15 minutos) y el suero obtenido fue reservado a -80 °C, hasta el momento de la determinación hormonal por radioinmunoanálisis.

#### V.5.2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA).

Las muestras fueron analizadas por radioinmunoanálisis mediante un Kit comercial Coat-A-Count para corticosterona de rata, suministrado por la casa comercial *Diagnostic Products Corporation*. El rango de la curva estándar estaba comprendido entre 20-2000 ng/ml. El límite de sensibilidad del ensayo fue de 5,7 ng/ml. Las variaciones intra-inter ensayo fueron aproximadamente de 5% y 10% respectivamente. Estas valoraciones fueron llevadas a cabo en el Instituto Ramón y Cajal (CSIC), en colaboración con la Dra. Carmen Guaza.

## IV.6. VALORACIÓN DE CATECOLAMINAS.

### IV.6.1. DISECCIÓN DE AREAS ENCEFÁLICAS.

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se procedió a la extracción del cerebro, que fue congelado hasta la realización de la valoración de catecolaminas, momento en el que, con los cerebros aún congelados, se retiró el hipotálamo medio basal, y se obtuvieron dos secciones de  $\pm 500 \mu\text{m}$ , conteniendo Caudado Putamen y Sustancia Nigra. Estas secciones se colocaron sobre portaobjetos y se cubrieron con PCA 0,2 N- DHBA 25 ng/ml. Sobre las correspondientes secciones se diseccionaron el Caudado Putamen y la Sustancia Nigra con ayuda de un bisturí.

### IV.6.2. VALORACIÓN DE CATECOLAMINAS POR HPLC.

Se analizaron las concentraciones de NA, DA y ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica. Para ello se homogeneizaron las muestras en frío por sonicación en 100  $\mu\text{l}$  de PCA 0,2 N - DHBA 25 ng/ml. Después se centrifugó a 7500 r.p.m durante 2 minutos. El sobrenadante correspondiente al caudado putamen se diluyó 1/10 con PCA 0,2 N-DHBA 25 ng/ml. El precipitado se utilizó para cuantificar las proteínas totales por el método de Lowry.

El sistema de HPLC se componía de los siguientes elementos:

- una bomba isocrática (Spectra-Physics modelo 8700XR) acoplada a un inyector para 0,02 ml de muestra.
- la columna fue de fase reversa Nucleosil 100-5, C-18, 15x0,46 cm, Chrompack.

- la fase móvil estaba compuesta por: ácido cítrico 100 mM, acetato sódico 100 mM, EDTA 1 mM, sulfonato de heptano 1,2 mM, metanol 5-7%. Se preparó con agua desionizada ultrapura (miliQ) y se ajustó a pH 3,9. Se filtró (a través de filtros de 0,22  $\mu$ m) y se desgasificó con helio; el flujo de trabajo fue 0,8.
- El eluyente se monitorizó con un sistema analítico de detección electroquímica: célula previa= +360 mV, célula analítica 1: +50 mV, célula analítica 2: -340 mV.
- La señal procedente de la célula analítica 2 fue recogida y analizada con ayuda de un integrador-registrador (Spectra-Physic, modelo 4290).

Estas valoraciones fueron llevadas a cabo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.C.M., en colaboración con el Dr. Ramos.

#### IV.7. EVOLUCIÓN PONDERAL.

Desde el nacimiento y cada día durante la duración del tratamiento neonatal se realizó un seguimiento del peso corporal de cada animal. Asimismo, se obtuvieron los pesos de los animales correspondientes a los 20 y 25 días, según la edad de las pruebas. Además, los animales adultos que recibieron tratamiento neonatal fueron pesados cada diez días a partir del día 30 de edad y hasta el día 80 e igualmente se pesaron el día en que se les realizaron las distintas pruebas. Igualmente fueron pesados, cada día de tratamiento, los animales que recibieron la administración crónica de naltrindol en la edad adulta.

Para obviar las posibles diferencias que pudiera haber en el peso en el momento del nacimiento (antes de ser sometidos a ningún tratamiento) y que pudieran influir en el desarrollo de este parámetro, calculamos lo que hemos denominado tasa de crecimiento del animal:

Tasa de crecimiento el día  $d$  :  $\text{Peso del animal el día } d / \text{Peso del animal el día } 0$

Esta tasa nos permite expresar el peso diario referido al peso del día de nacimiento del animal (x veces el peso al nacer) (De Cabo y Viveros 1997).

## IV.8. DISEÑO EXPERIMENTAL.

A continuación se explica el diseño experimental utilizado en cada uno de los estudios realizados en esta Tesis Doctoral, en el mismo orden en que se expusieron los objetivos correspondientes (Sección II). Recordemos que, por la razón ya expuesta, en aquellos estudios que incluían animales adultos, sólo se utilizaron machos.

### IV.8.1. ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE DIFERENTES TIPOS DE RECEPTORES OPIOIDES DURANTE EL PERÍODO NEONATAL. INFLUENCIA DEL SEXO Y LA MANIPULACIÓN.

Los estudios que a continuación se indican se han realizado en ratas neonatales de 20 días de edad. En todos los casos los animales reciben el tratamiento neonatal (ver apartado IV.2.1) y una vez cumplida la edad prefijada son sometidos a una serie de pruebas.

En las pruebas realizadas a estos animales no destetados la madre fue retirada de la camada y las crías fueron separadas por sexos. En todos los casos, el día de las pruebas los animales fueron pesados y sometidos a un período de habituación a la sala una hora antes del comienzo del protocolo experimental. Durante las pruebas los animales permanecieron sin alimento y bebida para homogeneizar en lo posible sus condiciones. En el momento en que a un animal se le comenzó a realizar cualquier protocolo de prueba se le aisló en una jaula pequeña hasta la finalización del mismo.

Cada grupo experimental contenía individuos de al menos 4 camadas diferentes que fueron testados en al menos dos días distintos, con el objetivo de minimizar la posible variabilidad existente entre camadas y entre días. En cada estudio se especificará el sexo o sexos que fueron empleados.

IV.8.1.1. Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre las respuestas antinociceptivas y comportamentales a agonistas selectivos  $\mu$  (alfentanil) y  $\kappa$  (CI-977).

*Grupos experimentales.*

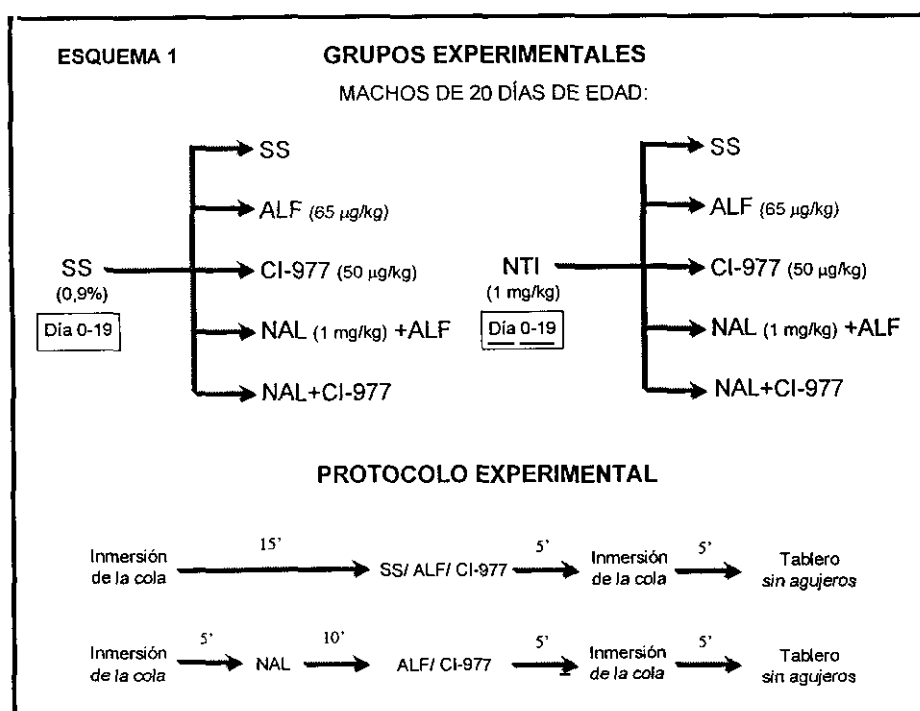
En este estudio sólo se utilizaron machos. Se formaron dos grupos de tratamiento neonatal, uno contenía animales tratados neonatalmente con NTI y otro con SS (ver apartado IV.2.1). A la edad de 20 días y dentro de cada grupo de tratamiento neonatal arriba mencionado, se formaron los 5 siguientes grupos de tratamiento agudo: Un grupo control (SS) que recibió una única inyección de solución salina 0.9% i.p.; dos grupos que recibieron una inyección de alfentanil (ALF) (65  $\mu$ g/kg, i.p.) (Janssen) o CI-977 (50  $\mu$ g/kg, i.p.) (Parke Davis), y dos grupos adicionales para estudios de antagonismo, que recibieron un inyección de naloxona (NAL) (1mg/kg, i.p.) (RBI) previa a la administración de ALF (NAL+ALF) o CI-977 (NAL+CI-977) (Esquema 1). Las dosis de ALF y CI-977 fueron elegidas basándonos en trabajos previos realizados por otros autores (Crook y col. 1992, Kitchen y col. 1995a) y en pruebas realizadas en nuestro laboratorio. El volumen máximo utilizado fue de 0.13 ml / 20g.

*Protocolo experimental*

Las respuestas nociceptivas fueron registradas mediante el test de inmersión de la cola, 15 minutos antes de la administración de SS, ALF o CI-977 (latencia basal) y 5 minutos después del tratamiento (latencia final), tiempo que corresponde a un pico antinociceptivo para los agonistas empleados (Crook y col. 1992, Kitchen y col. 1995a) en este paradigma. El antagonista naloxona fue administrado 10 minutos antes de la administración del agonista (Crook y col. 1992). Para comparar los distintos tratamientos, la antinocicepción fue cuantificada utilizando el cociente de latencias según la fórmula indicada en el apartado IV.3.1.

Las respuestas comportamentales fueron registradas en el tablero sin agujeros (ver apartado IV.4.2). Los animales fueron sometidos individualmente a esta prueba 5 minutos después de la finalización del *test* nociceptivo (ver esquema 1).

Todas las pruebas fueron llevadas a cabo en luz roja.



#### *Análisis estadístico.*

Los datos obtenidos del *test* de la inmersión de la cola (cocientes de latencias) y el tablero sin agujeros fueron analizados mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA) (factores: tratamiento neonatal y tratamiento agudo). Los grupos incluidos en el análisis estuvieron crónicamente tratados con salino o naltrindol y posteriormente fueron estudiados los efectos agudos de agonistas  $\mu$  o  $\kappa$  y el antagonismo por naloxona. El *test* de comparación múltiple aplicado fue el Student-Newman-Keuls con un nivel de significación  $p < 0,05$ . Para el análisis de las latencias basales fue utilizado el *test* no pareado t-Student.

IV.8.1.2. Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre la evolución de las respuestas antinociceptivas al agonista  $\mu$  morfina. Efectos de la manipulación de los animales. Diferencias sexuales.

#### *Grupos experimentales*

El efecto del tratamiento neonatal sobre las respuestas antinociceptivas a morfina se estudió en ambos sexos y a la edad de 20 días. Se diseñaron dos grupos de tratamiento neonatal, uno formado por animales tratados durante el período neonatal con NTI y otro por animales tratados durante el mismo período con SS (ver apartado IV.2.1). Dentro de cada grupo de tratamiento neonatal, se formaron dos grupos de tratamiento agudo. Uno contenía animales que recibieron una única inyección i.p de MF (2 mg/kg, 0,1ml/20g), y el otro animales que recibieron una inyección i.p con un volumen equivalente de SS 0,9%. En estudios piloto observamos que la dosis de morfina elegida para estos experimentos producía respuestas submaximales sin inducir ningún efecto sedativo notable que podría haber interferido con la ejecución de la prueba nociceptiva de inmersión de la cola.

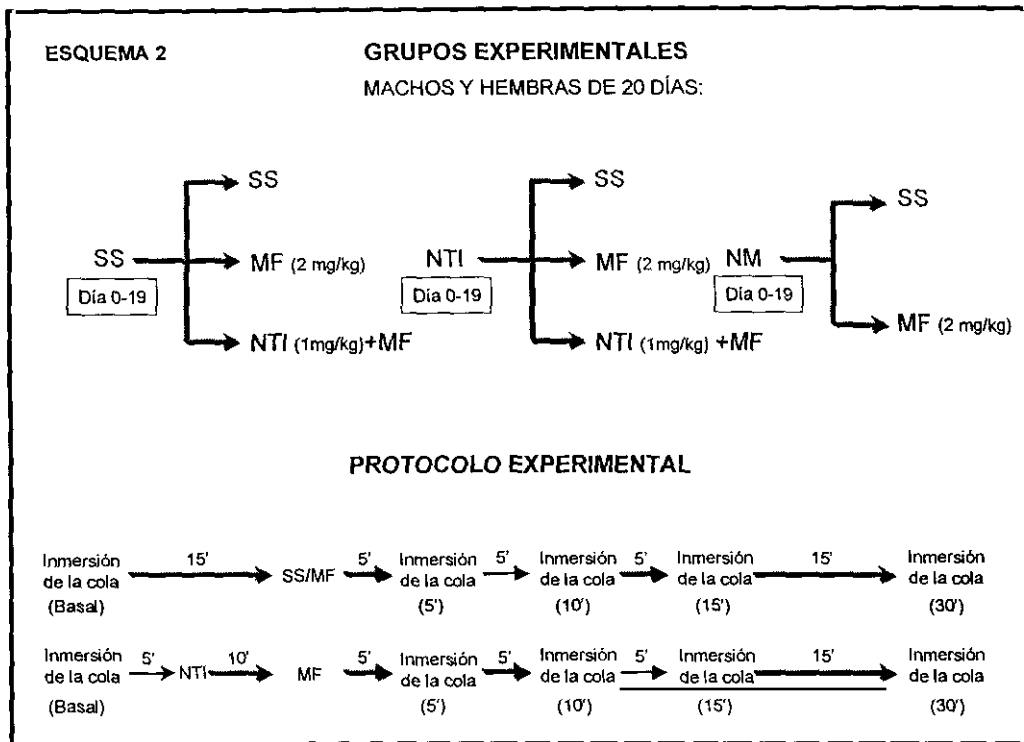
Con el objetivo de estudiar el efecto de la manipulación de los animales sobre la respuesta nociceptiva a morfina, se incluyeron además grupos de animales de ambos sexos de 20 días de edad que no sufrieron ninguna manipulación durante el período neonatal (no pesados ni tratados).

Dentro de los grupos de tratamiento neonatal SS y NTI se incluyeron además grupos de animales que recibieron una inyección aguda de NTI (1mg/kg, 0,1ml/20g) previa a la de MF (NTI+MF) (ver esquema 2).

#### *Protocolo experimental.*

Como prueba nociceptiva se utilizó el *test* de la inmersión de la cola. Se registraron latencias de respuesta 15 minutos antes de la administración de SS o MF (latencia basal) y 5,

10, 15 y 30 minutos después de dichas administraciones, así conseguimos un registro de la evolución de las latencias nociceptivas a lo largo del tiempo. En los grupos que recibieron una administración aguda de NTI, éste fue administrado 10 minutos antes de la inyección de MF (ver esquema 2).



### Análisis estadístico

Los efectos del sexo y los tratamientos neonatales (manipulación postnatal y administración crónica de naltrindol) sobre las latencias basales nociceptivas, y la influencia del sexo en la antinocicepción inducida por morfina en los animales no manipulados, fueron evaluados mediante Anova de dos vías. Los efectos de los tratamientos neonatales sobre la antinocicepción inducida por morfina fueron estudiados comparando las áreas bajo la curva calculadas a partir de los cocientes de latencia obtenidos a lo largo de un período de 30 minutos, mediante Anova de dos vías (tratamiento neonatal, tratamiento agudo (salino o morfina). Se realizaron Anovas de una vía adicionales cuando fue apropiado. Para las

comparaciones múltiples se utilizó el *test* de Student-Newman Keuls, con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

#### IV.8.2. IMPLICACIONES DEL RECEPTOR $\delta$ EN LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADRENOCORTICAL DURANTE EL PERÍODO NEONATAL. EFECTOS DEL SEXO Y DE LA MANIPULACIÓN.

- Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol y de la manipulación sobre la respuesta de corticosterona al estrés.

##### *Grupos experimentales.*

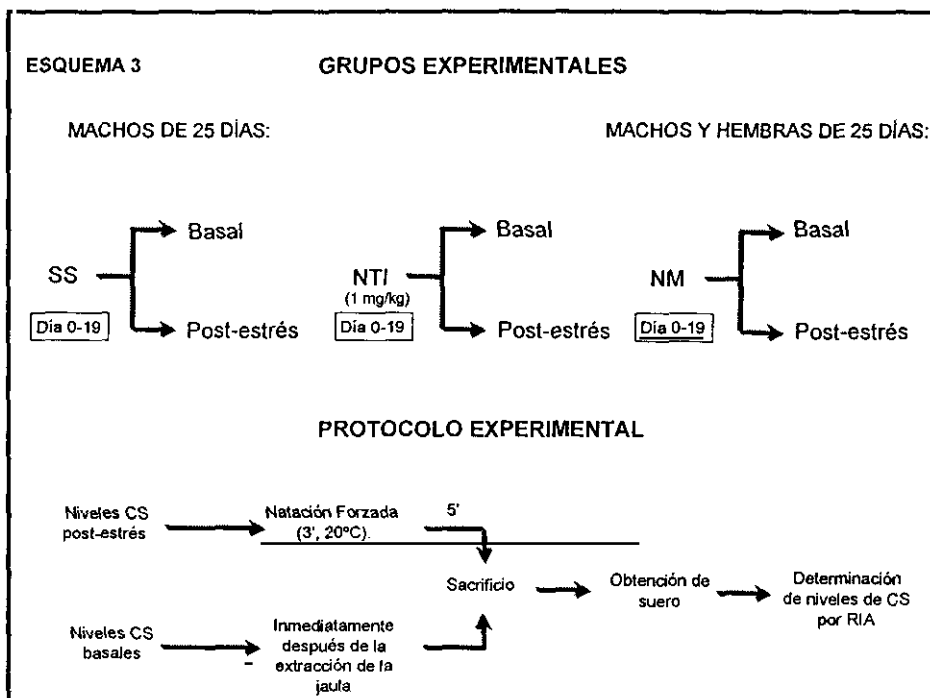
Este estudio fue realizado en animales de 25 días de edad, en los que se ha superado el período hipoactivo del eje HHA. Se formaron dos grupos de tratamiento farmacológico neonatal. Uno de los grupos contenía animales tratados neonatalmente con NTI y el otro animales tratados neonatalmente con SS (ver apartado IV.2.1). En este estudio, únicamente se trabajó con machos tratados farmacológicamente, ya que disponíamos de datos previos obtenidos en hembras tratadas de forma idéntica (Antelo 1998).

Como ya hemos comentado en la Introducción, se ha demostrado que la exposición a diferentes tipos de estímulos estresantes durante el período postnatal puede afectar la maduración del eje HHA, y a la duración del período de hiporrespuesta al estrés en la rata (Biagini y col. 1991, Gray 1991). Por ello, también hemos estudiado el posible efecto de la manipulación (peso e inyección de los animales durante el período de tratamiento neonatal) sobre la respuesta de corticosterona (CS) al estrés. Así, los efectos de la manipulación se han estudiado incluyendo un grupo control adicional en el que los animales no fueron manipulados (no pesados ni tratados) durante el período neonatal. Dado que en este caso no disponíamos de datos previos obtenidos en hembras, el estudio se llevó a cabo en animales de ambos sexos. Por tanto se diseñaron los grupos experimentales en función del tratamiento neonatal recibido (SS, NTI o NM) y los niveles de corticosterona que se fueran a medir (basales o post-estrés) (ver esquema 3).

Protocolo experimental.

Los animales fueron sometidos a un período de habituación de 1 hora, en una sala contigua a la sala en la que tenía lugar la prueba de natación, que a su vez era contigua a la habitación en la que se producía la decapitación de los animales.

El protocolo de estrés consistió en una sesión de natación durante 3 minutos en agua a 20°C (Antelo y col. 1998, Jackson y Kitchen 1989b, Pujol y col. 1993). La natación tuvo lugar en una piscina cilíndrica con las paredes de metacrilato, de 30 cm de diámetro y 50 cm de altura. La piscina se llenó hasta una altura de 30 cm. Los animales fueron sacrificados por decapitación y las muestras de sangre fueron recogidas del tronco inmediatamente después de recoger al animal de su jaula (niveles basales) ó 5 minutos después de la sesión de natación (niveles post-estrés) (ver esquema 3). Este tiempo representa el pico de analgesia inducida por estrés en este protocolo de estrés (Antelo y col. 1998, Jackson y Kitchen 1989b, Kitchen y Pinker 1990). Las muestras fueron procesadas según se explica en el apartado IV.5.2.



*Análisis estadístico.*

Los datos fueron analizados mediante Anova de dos vías (factores: tratamiento neonatal, protocolo de prueba). También se analizaron las diferencias sexuales. El análisis de comparación múltiple utilizado fue el *test* Student-Newman-Keuls con un nivel de significación  $p < 0,05$ .

#### IV.8.3. ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE RECEPTORES $\mu$ - $\delta$ , CON ESPECIAL ATENCIÓN A LA DIMENSIÓN AFECTIVA DEL DOLOR EN ANIMALES ADULTOS.

-Efectos del tratamiento crónico con naltrindol sobre las respuestas antinociceptivas al agonista  $\mu$  morfina.

##### *Grupos experimentales.*

El estudio fue realizado con ratas macho adultas (90-100 días). Los animales se mantuvieron alojados en jaulas por grupos de 5. Aproximadamente la mitad de los animales de cada jaula recibió un tratamiento crónico s.c. con NTI y la otra mitad con SS, durante 8 días consecutivos (ver apartado IV.2.2). Un día después de la finalización del tratamiento crónico y dentro de cada uno de los grupos arriba indicados se diseñaron 3 grupos de tratamiento agudo: un grupo control que recibió una única inyección s.c. de SS 0.9%, y dos grupos que recibieron una inyección s.c. de sulfato de morfina (MF) 2 mg/kg ó 5 mg/kg, respectivamente. El volumen de inyección fue de 1ml/kg.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio encontramos que dosis de 10, 15 y 20 mg/kg de MF causaban, al menos en algunos animales, excesiva sedación y vocalización débil y desincronizada, especialmente a la dosis más alta. Por tanto elegimos las dosis de 2 y 5 mg/kg, que produjeron respuestas submáximas y fácilmente observables a los 15 minutos de la inyección.

Cada grupo experimental contenía animales de al menos 4 jaulas diferentes que fueron testados en al menos dos días distintos para minimizar la posible variabilidad entre jaulas y entre días.

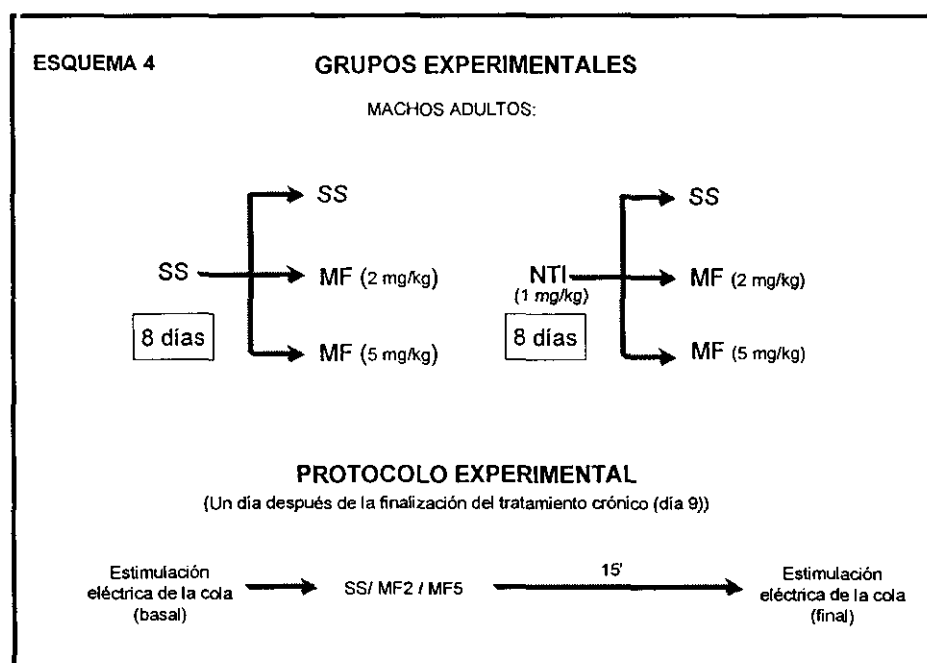
Por tanto, para este estudio se diseñaron 6 grupos experimentales en función del tratamiento crónico (SS o NTI), y del posterior tratamiento agudo (SS, MF 2 mg/kg, MF 5 mg/kg) recibido (ver esquema 4).

#### Protocolo experimental.

El día de la prueba los animales fueron pesados y trasladados a la sala de experimentación, en la que permanecieron durante una hora desprovistos de comida y agua. Las pruebas tuvieron lugar entre las 10.30-15.30 h. y en condiciones de luz roja, dado que estos animales se mantuvieron en todo momento con el ciclo lumínico invertido.

Para valorar la antinocicepción utilizamos el *test* de la estimulación eléctrica de la cola (ver apartado IV.3.2). Las respuestas nociceptivas fueron registradas inmediatamente antes de la inyección aguda de MF o SS (respuestas basales) y 15 minutos después del tratamiento (ver esquema 4).

Una vez finalizado el *test*, el animal fue devuelto a una jaula diferente a la original, para evitar interacciones con los animales que esperaban ser sometidos a la prueba.



*Análisis estadístico*

Para evaluar los efectos del tratamiento crónico con NTI sobre las respuestas basales, se analizaron los datos obtenidos de todos los animales incluidos en el estudio mediante un *test* de Student. Los efectos de la administración crónica de NTI sobre la respuesta a MF fueron evaluados analizando los % MPE obtenidos de los diferentes grupos experimentales, mediante un Anova de dos vías (factores: tratamiento crónico, tratamiento agudo) para cada respuesta registrada (motora, vocalización y vocalización postdescarga). El *test* de comparación múltiple aplicado fue el Student-Newman-Keuls con un nivel de significación  $p < 0,05$ .

#### IV.8.4 ESTUDIO SOBRE IMPLICACIONES FUNCIONALES DEL RECEPTOR $\delta$ EN EL DESARROLLO Y MODULACIÓN DE RESPUESTAS COMPORTAMENTALES Y FISIOLÓGICAS AL ESTRÉS. CORRELACIONES NEUROQUÍMICAS.

IV.8.4.1. Efectos de tratamientos agudo y crónico con naltrindol sobre respuestas nociceptivas y comportamentales en animales neonatales.

##### *Grupos experimentales.*

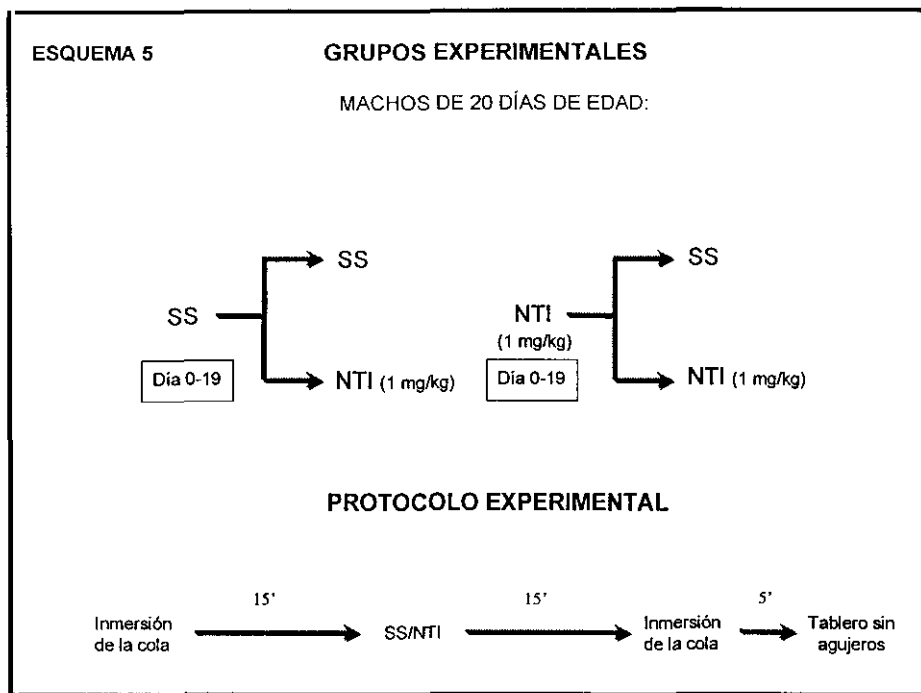
En este estudio sólo se utilizaron machos. Se formaron dos grupos de tratamiento neonatal. Un grupo de animales tratados crónicamente durante el período neonatal con NTI y otro con SS (ver apartado IV.2.1). A la edad de 20 días y dentro de cada grupo de tratamiento neonatal mencionado se estudiaron los dos grupos de tratamiento agudo siguientes: un grupo que recibió una única inyección i.p de NTI (1 mg/kg, 0,1ml/20g) y otro grupo (control) que recibió una única inyección i.p con un volumen equivalente de SS 0,9% (ver esquema 5).

Así para cada edad quedaron diseñados 4 grupos experimentales en función del tratamiento neonatal (SS o NTI) y el tratamiento agudo (SS o NTI) recibido.

##### *Protocolo experimental*

Las respuestas nociceptivas fueron medidas mediante la prueba de la inmersión de la cola. Se registraron latencias de respuesta 15 minutos antes (latencia basal) y después (latencia final) de la administración del SS o NTI.

Las respuestas comportamentales en el tablero sin agujeros fueron registradas a los 20 minutos de la inyección del SS o NTI, es decir a los 5 minutos de la toma de la latencia final (ver esquema 5). La elección de estos tiempos fue realizada basándonos en estudios previos (Viveros y col. 1997).



#### *Análisis estadístico.*

Los datos obtenidos del *test* de la inmersión de la cola (cocientes de latencia) y del tablero sin agujeros fueron analizados mediante Anova de dos vías (factores: tratamiento neonatal, tratamiento agudo). El *test* de comparación múltiple aplicado fue el Student-Newman-Keuls con un nivel de significación  $p < 0,05$ . Para el análisis de las latencias nociceptivas basales se utilizó el *test* de Student.

#### IV.8.4.2. Efectos a corto plazo del tratamiento crónico con naltrindol en animales adultos.

-Efectos del tratamiento crónico con naltrindol sobre el comportamiento y los niveles de corticosterona.

#### *Grupos experimentales.*

Se utilizaron machos adultos de aproximadamente 90 días de edad. La mitad de los animales recibió un tratamiento crónico i.p con NTI y la otra mitad con SS (ver apartado IV.2.2).

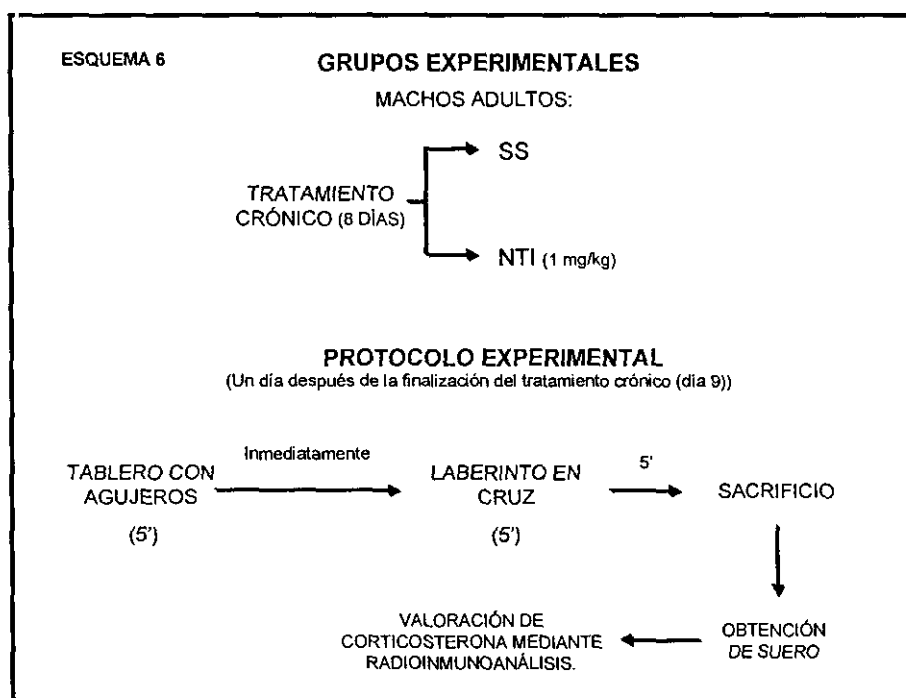
De acuerdo con lo expuesto se formaron 2 grupos experimentales en función del tratamiento crónico recibido (SS o NTI).

*Protocolo experimental.*

Al día siguiente de la última inyección del tratamiento crónico, todos los animales fueron testados en el tablero con agujeros (apartado IV.4.1) e inmediatamente después en el laberinto en cruz (apartado IV.4.3).

Estas pruebas de comportamiento suponen un estrés para el animal. Con el objetivo de estudiar la influencia del tratamiento crónico con NTI sobre la respuesta de corticosterona al estrés, se procedió a la obtención de muestras de sangre de estos animales una vez finalizadas las pruebas de comportamiento. Los animales fueron sacrificados por decapitación 5 minutos después de la finalización de la prueba del laberinto en cruz y las muestras obtenidas fueron procesadas según se indica en el apartado IV.5.2. (ver esquema 6).

Los animales que durante la prueba cayeron del laberinto en cruz fueron excluidos del estudio en este aparato y de las valoraciones de corticosterona.



*Análisis estadístico.*

Los datos obtenidos en cada una de las pruebas comportamentales, así como en las valoraciones de corticosterona, fueron analizados mediante el *test* de Student.

IV.8.4.3. Efectos a largo plazo del tratamiento crónico con naltrindol en animales adultos.

-Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre el comportamiento y la respuesta de corticosterona al estrés, en ratas adultas.

Los animales utilizados en este estudio nacieron en el animalario de cruzamientos estandarizados. De estos cruzamientos obtuvimos 8 camadas (40 machos y 40 hembras). La mitad de los animales de cada camada (machos y hembras) recibieron un tratamiento neonatal con NTI y la otra mitad con SS según lo descrito en el apartado IV.2.1. Estos animales fueron destetados el día 22 de edad momento en el que se fueron alojados en jaulas de 4-6 animales del mismo sexo. A partir de este momento únicamente nos quedamos con los machos para la realización de este estudio. Desde entonces se dejaron crecer hasta la edad adulta. La única manipulación que se produjo en este tiempo fue la necesaria para la obtención de los pesos corporales cada 10 días a partir del día 30 de edad y hasta el día de la realización de las pruebas. Estos pesos fueron registrados con el objetivo de estudiar el posible efecto del tratamiento neonatal con NTI sobre la evolución ponderal de los animales hasta la edad adulta. Dentro de una misma jaula se encontraban animales de ambos tratamientos neonatales (SS o NTI).

Así quedaron diseñados 2 grupos experimentales (n=20) según el tratamiento crónico recibido durante el periodo neonatal (SS o NTI)

Una vez alcanzada la edad adulta (aproximadamente 90 días) estos animales fueron sometidos a distintas pruebas. Se realizaron pruebas de comportamiento y se midieron respuestas de corticosterona al estrés.

### Comportamiento

Todos los animales experimentales fueron sometidos a la prueba de tablero con agujeros e inmediatamente después la prueba de laberinto en cruz (apartados IV.4.1. y IV.4.3. respectivamente). Los animales que se cayeron del laberinto en cruz fueron colocados de nuevo en el aparato para que todos los animales estuvieran en las mismas condiciones en las pruebas posteriores, sin embargo, la *n* que se presenta para el laberinto en cruz es menor puesto que los datos obtenidos de estos animales no se analizaron.

### *Análisis estadístico.*

Los datos obtenidos en el tablero con agujeros y en el laberinto en cruz fueron analizados mediante un *test* de Student.

### Valoración de niveles basales y post-estrés de corticosterona.

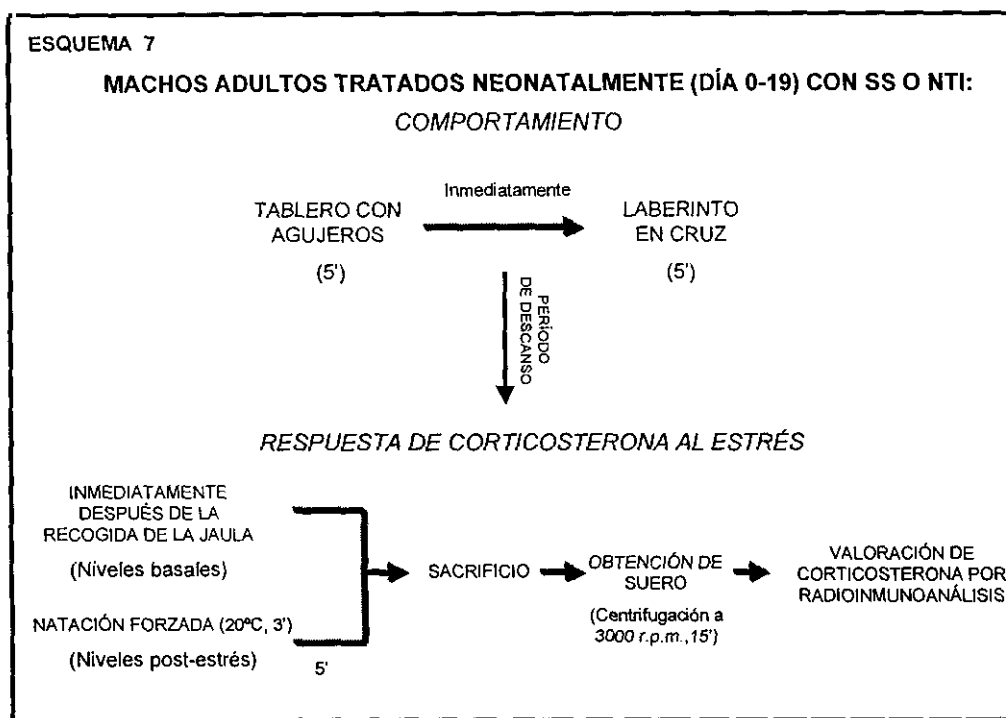
Transcurrido un período de descanso se procedió al estudio de los niveles de corticosterona en suero basales y en respuesta al estrés. La mitad de los animales de ambos tratamientos neonatales (SS o NTI) fueron estresados mediante el *test* de natación forzada. De la otra mitad se obtuvieron los niveles basales de corticosterona.

De esta forma se formaron 4 grupos experimentales en función del tratamiento crónico recibido durante el período neonatal (SS o NTI) y los niveles de corticosterona que se fueran a medir (basales, post-estrés) (ver esquema 7).

La natación tuvo lugar en agua a 20°C durante 3 minutos en una piscina cilíndrica de paredes de metacrilato de 40 cm de diámetro y 60 cm de altura. La piscina se llenó de agua

hasta alcanzar 44 cm, altura suficiente para que el animal no tocara el fondo y no pudiera agarrarse a los bordes de la piscina.

Tras un período de 1 hora de habituación a la sala sin comida ni bebida, los animales fueron sacrificados por decapitación y las muestras de sangre fueron recogidas del tronco inmediatamente después de recoger al animal de su jaula (niveles basales) ó 5 minutos después de la sesión de natación (niveles post-estrés). Las muestras fueron procesadas según se explica en el apartado IV.5.2.

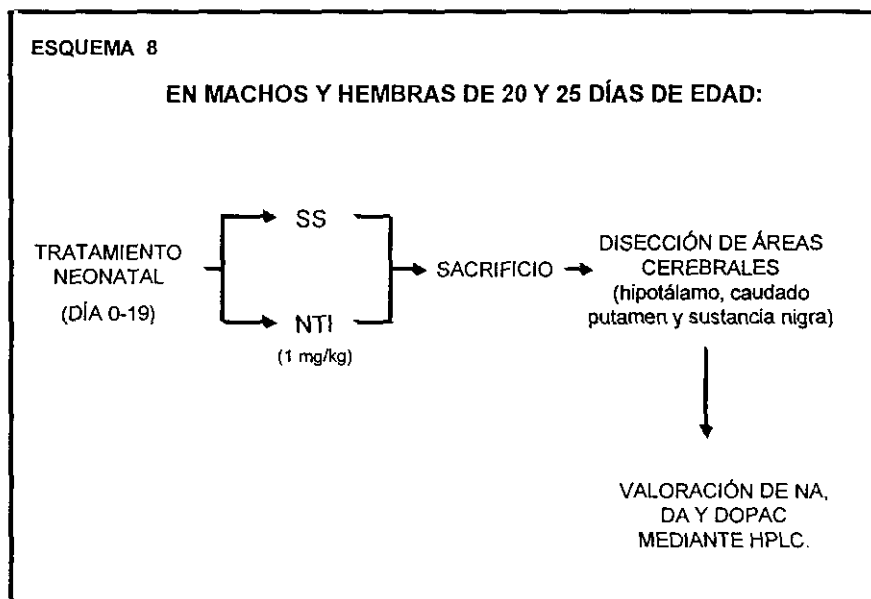


*Análisis estadístico.*

Los datos obtenidos de las valoraciones de corticosterona se analizaron mediante un Anova de dos vías (factores: tratamiento neonatal (SS o NTI), protocolo experimental (basal o post-estrés). El análisis de comparación múltiple aplicado fue el Student-Newman-Keuls, con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

IV.8.4.4. Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre los niveles de monoaminas en distintas áreas cerebrales de animales neonatales. Diferencias sexuales.

Para la realización de este experimento se formaron 8 grupos experimentales, en función del sexo (machos y hembras), edad (20-predestete, y 25 días-postdestete), y tratamiento neonatal recibido desde el día 0 al 19 (SS o NTI). Los animales fueron sacrificados por decapitación y el cerebro fue extraído y congelado inmediatamente. Posteriormente se procedió a la disección del hipotálamo, caudado putamen y sustancia nigra (apartado IV.6.1). En estas regiones fueron valorados los niveles de NA, DA y su metabolito el ácido dihidroxi-fenil-acético (DOPAC) mediante HPLC según se indica en el apartado IV.6.2. (ver esquema 8).



*Análisis estadístico.*

Los datos obtenidos en este experimento se analizaron mediante Anovas de dos vías, sexo, tratamiento y edad, tratamiento. Como prueba de comparación múltiple se utilizó el test de Tukey.



## **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

A continuación se exponen los resultados obtenidos en los diferentes estudios, y su correspondiente discusión, en el mismo orden en el que se expusieron los objetivos. En todos los casos las significaciones estadísticas que se señalan en tablas y figuras son las correspondientes a los análisis *post-hoc*.

## **V.1. ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE DIFERENTES TIPOS DE RECEPTORES OPIOIDES DURANTE EL PERÍODO NEONATAL. INFLUENCIA DEL SEXO Y LA MANIPULACIÓN.**

### **V.1.1. EFECTOS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL SOBRE LAS RESPUESTAS ANTINOCICEPTIVAS Y COMPORTAMENTALES A AGONISTAS SELECTIVOS $\mu$ (ALFENTANIL) Y $\kappa$ (CI-977).**

## **RESULTADOS**

### *Latencias nociceptivas basales.*

Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento neonatal con naltrindol sobre las latencias nociceptivas basales en el *test* de inmersión de la cola, se analizaron los datos obtenidos de todos los animales incluidos en el estudio. No se encontró efecto significativo del tratamiento neonatal sobre las respuestas basales (animales tratados neonatalmente con suero salino  $1,71 \pm 0,06$ ,  $n=51$ ; animales tratados neonatalmente con naltrindol:  $1,89 \pm 0,08$ ,  $n=51$ ).

### *Respuestas antinociceptivas y comportamentales a alfentanil y CI-977.*

El Anova de dos vías (factores: tratamiento neonatal, tratamiento agudo) realizado con los datos obtenidos en machos de 20 días, en el *test* de inmersión de la cola, reveló los

siguientes resultados: con respecto al agonista  $\mu$  alfentanil, se encontró un efecto significativo del tratamiento agudo ( $p=0,001$ ) y una interacción significativa entre factores ( $p=0,01$ ). El análisis *post-hoc* mostró que el alfentanil causó una antinocicepción significativa en los animales tratados neonatalmente con suero salino y que este efecto fue antagonizado por naloxona. Sin embargo, el agonista  $\mu$  no indujo respuesta antinociceptiva en los animales tratados neonatalmente con naltrindol (Figura 1).

Para el agonista  $\kappa$  CI-977, el Anova de dos vías reveló un efecto significativo del tratamiento agudo ( $p<0,0001$ ), mientras que el tratamiento neonatal y la interacción entre el tratamiento neonatal y el tratamiento agudo no fueron significativos. El CI-977 causó un efecto antinociceptivo en todos los animales (tratados neonatalmente con suero salino o naltrindol) que fue antagonizado por naloxona (Figura 2).

El análisis de los datos obtenidos del tablero sin agujeros no reveló interacción significativa entre el tratamiento neonatal y el agudo para ninguno de los parámetros registrados, indicando que el tratamiento neonatal con naltrindol no modificó significativamente las respuestas a alfentanil o CI-977 en esta prueba. El análisis de las respuestas a alfentanil reveló efectos significativos del tratamiento agudo para la postura erguida ( $p<0,0001$ ) y un efecto residualmente significativo para la deambulación interna ( $p=0,06$ ). De hecho, los animales tratados con alfentanil mostraron un incremento significativo de la postura erguida, que fue antagonizado por naloxona, y una tendencia a aumentar la deambulación interna (Tabla 1, Figura 3).

El análisis de las respuestas a CI-977 mostró efectos significativos del tratamiento agudo sobre la deambulación externa ( $p=0,01$ ), deambulación total ( $p<0,01$ ), postura erguida ( $p<0,0001$ ) y *grooming* ( $p<0,0001$ ). El tratamiento agudo con CI-977 produjo un descenso significativo en todos estos parámetros. En algunos animales se observaron respuestas de Straub y sedación tras la administración del agonista  $\kappa$ . La naloxona

antagonizó los efectos del CI-977 sobre la deambulación y redujo sus efectos sobre la postura erguida, pero no previno los efectos sobre el *grooming* (Tabla 1, Figura 4).

**TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)  
INMERSIÓN DE LA COLA  
MACHOS DE 20 DÍAS  
RESPUESTA A ALFENTANIL**

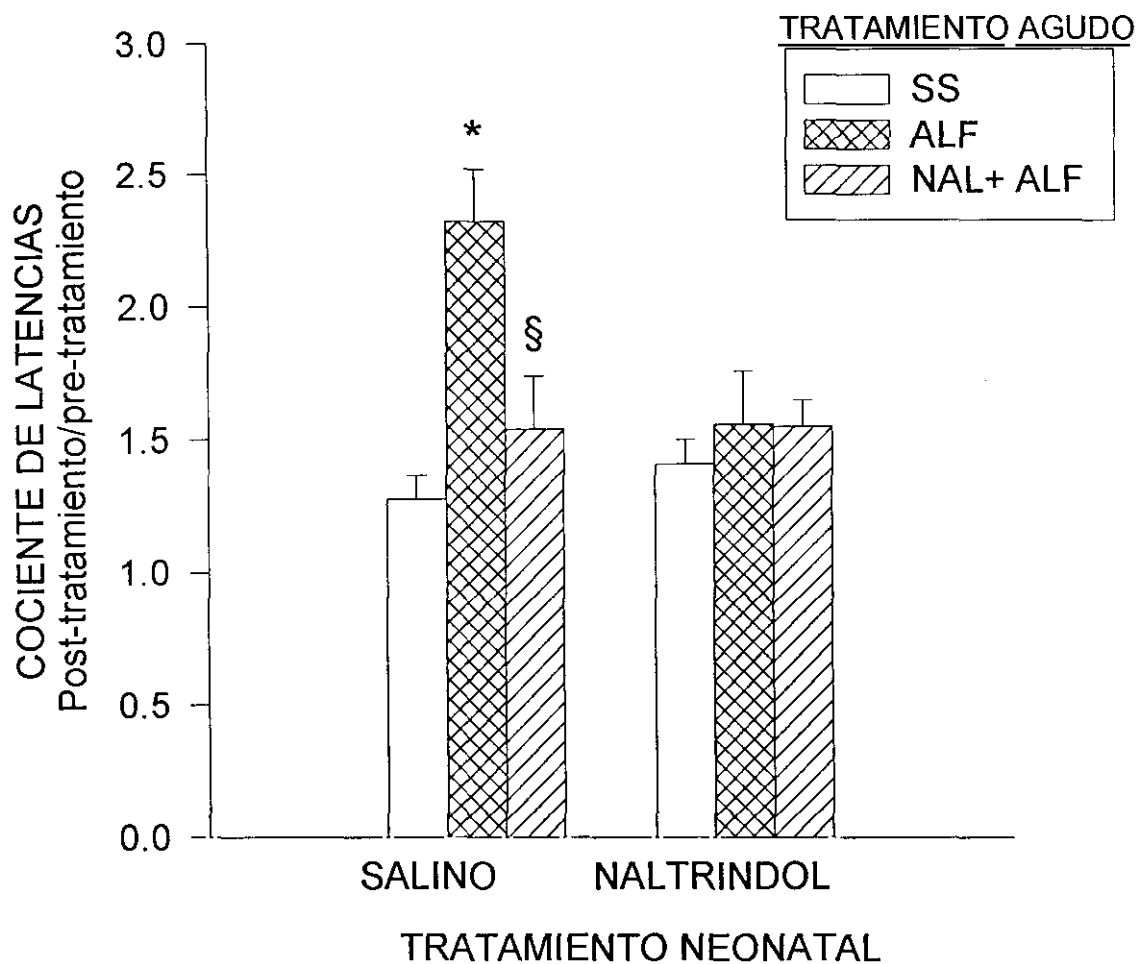


Figura 1. Los histogramas muestran la media  $\pm$  e.e.m. de 7-11 animales.

\*  $p < 0,05$  frente al grupo control tratado de forma aguda con SS.

§  $p < 0,05$  frente al grupo tratado de forma aguda con alfentanil (ALF).

SS: suero salino; NAL: naloxona.

**TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)  
 INMERSIÓN DE LA COLA  
 MACHOS DE 20 DÍAS  
 RESPUESTA A CI-977**

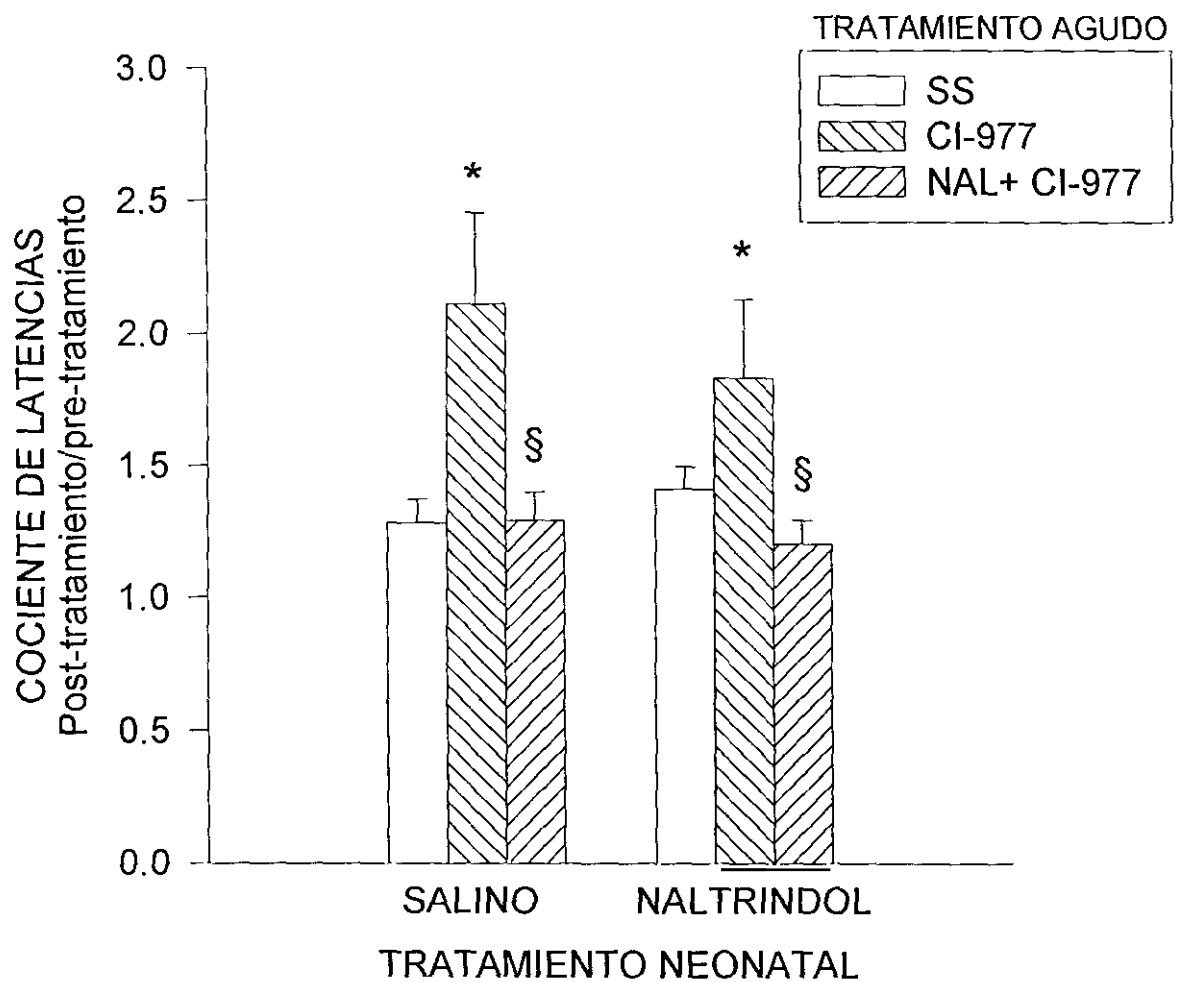


Figura 2. Los histogramas muestran la media  $\pm$  e.e.m. de 10-15 animales.

\*  $p < 0,05$  frente a los grupos controles tratados de forma aguda con SS.

§  $p < 0,05$  frente a los grupos tratados de forma aguda con CI-977.

SS: suero salino; NAL: naloxona.

**CAMPO ABIERTO (TABLERO SIN AGUJEROS)  
MACHOS DE 20 DÍAS DE EDAD  
TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)  
RESPUESTAS A ALFENTANIL Y CI-977**

TRATAMIENTOS		PARÁMETROS					
AGUDO	NEONATAL	DE	DI	DT	PE	G	DEF
SS	SS	169,6 ± 11,9	66,2 ± 6,9	235,8 ± 14,1	43,5 ± 3,0	3,4 ± 0,7	0,3 ± 0,2
	NTI	188,2 ± 15,8	59,8 ± 6,6	248,4 ± 19,2	40,3 ± 4,6	2,1 ± 0,4	0,1 ± 0,1
ALF	SS	169,9 ± 11,9	81,5 ± 7,2	251,4 ± 15,9	60,1 ± 5,3	2,1 ± 0,4	0,1 ± 0,1
	NTI	168,3 ± 9,5	79,7 ± 10,4	248,0 ± 13,2	56,6 ± 4,2	1,6 ± 0,4	0,1 ± 0,1
NAL + ALF	SS	144,1 ± 13,3	55,1 ± 10,7	199,3 ± 20,6	34,4 ± 3,2	3,0 ± 0,6	0,4 ± 0,3
	NTI	172,3 ± 15,6	72,6 ± 8,3	244,9 ± 21,2	33,1 ± 3,3	2,7 ± 0,8	0,6 ± 0,4
CI-977	SS	125,8 ± 18,4	42,3 ± 8,6	168,0 ± 25,5	7,7 ± 3,1	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,2
	NTI	134,5 ± 17,2	53,5 ± 6,8	188,0 ± 20,6	4,0 ± 1,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
NAL + CI-977	SS	152,1 ± 12,5	61,4 ± 10,6	217,3 ± 20,4	21,6 ± 2,5	0,9 ± 0,3	0,6 ± 0,2
	NTI	198,8 ± 29,9	59,9 ± 4,9	258,7 ± 31,5	21,3 ± 2,4	1,1 ± 0,5	0,3 ± 0,2

Tabla 1. Los valores corresponden a la media ± e.e.m de 7-15 animales. SS: salino, NTI: naltrindol, ALF: alfentanil, NAL: naloxona. DE: deambulaci3n externa, DI: deambulaci3n interna, DT: deambulaci3n total, PE: postura erguida, G: *grooming*, DEF: defecaci3n.

\* p<0,05 frente a los grupos tratados de forma aguda con SS. § p<0,05 frente a los grupos tratados con ALF.

¶ p<0,05 frente a los grupos tratados con CI-977.

**CAMPO ABIERTO (TABLERO SIN AGUJEROS)  
MACHOS DE 20 DÍAS DE EDAD  
TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)  
RESPUESTA A ALFENTANIL**

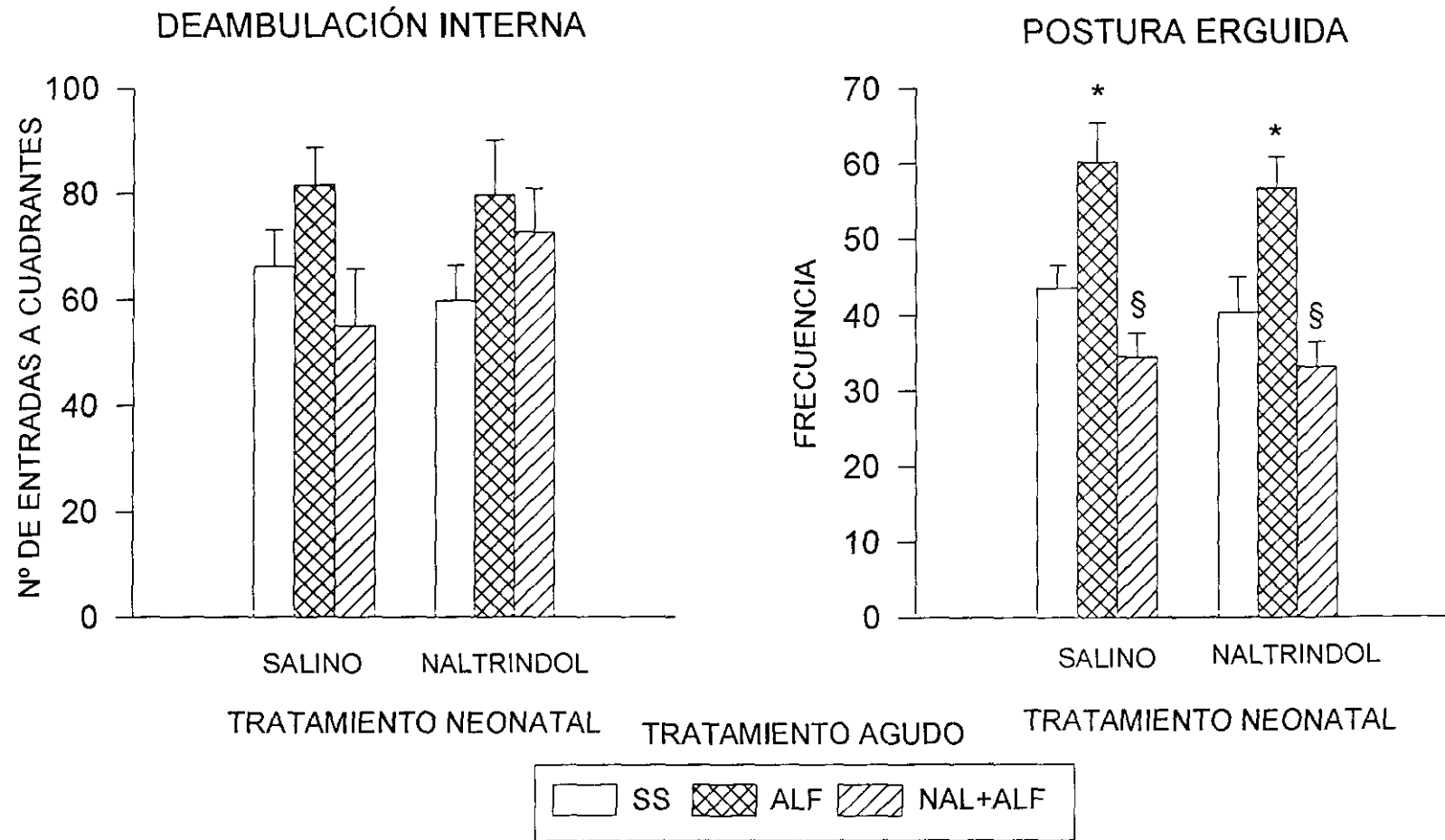


Figura 3. Los histogramas muestran la media  $\pm$  e.e.m. de 7-12 animales.

SS: salino; ALF: alfentanil; NAL: naloxona.

\*  $p < 0,05$  frente al grupo tratado de forma aguda con SS.

§  $p < 0,05$  frente al grupo tratado de forma aguda con ALF.

**CAMPO ABIERTO (TABLERO SIN AGUJEROS)  
MACHOS DE 20 DÍAS DE EDAD  
TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)  
RESPUESTA A CI-977**

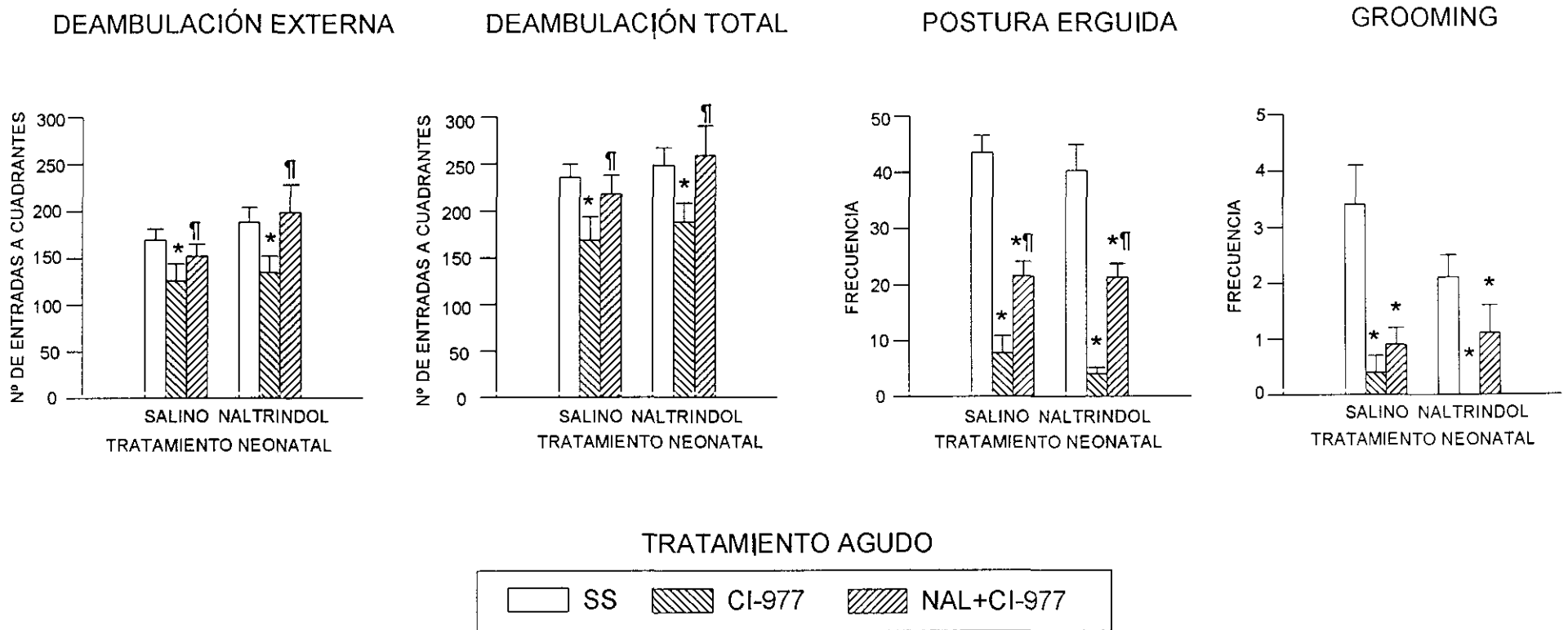


Figura 4. Los histogramas muestran la media  $\pm$  e.e.m. de 10-15 animales.

SS: salino; NAL: naloxona.

\*  $p < 0,05$  frente al grupo tratado de forma aguda con SS.

††  $p < 0,05$  frente al grupo tratado de forma aguda con CI-977.

## DISCUSIÓN

En este estudio encontramos que el tratamiento crónico con naltrindol no modificó las latencias basales obtenidas en el *test* nociceptivo. En una gran parte de los estudios realizados con animales sometidos a un tratamiento crónico con antagonistas opioides generales, se observa que los animales presentan hiperalgesia durante el tratamiento (Bardo y col. 1984, Tempel y col. 1985, Yoburn y col. 1986). Esta hiperalgesia se atribuye a la interrupción de una posible actividad tónica de los ligandos opioides endógenos. En nuestro estudio, el que los umbrales nociceptivos no se hayan visto modificados en el *test* de la inmersión de la cola, sugiere que los receptores opioides  $\delta$  no están implicados de forma importante en el control tónico de la nocicepción a nivel espinal. En estudios realizados con animales *Knockout*, se ha observado que los ratones deficientes en receptores  $\mu$  presentan latencias basales más bajas en la placa caliente y *tail-flick* (Sora y col. 1997b) y que los ratones deficientes en receptores  $\kappa$  presentan una sensibilidad aumentada al dolor visceral (Simonin y col. 1998). En animales deficientes en preproencefalina, se han observado latencias basales idénticas en los ratones mutantes y los normales en el *test* del *tail-flick*, mientras que se observaron latencias de salto significativamente más bajas en el *test* de la placa caliente (Köning y col. 1996). Estos resultados parecen sugerir que la acción de los opioides endógenos sobre los receptores  $\delta$  no debe ser importante en la modulación de la sensibilidad al dolor en pruebas que impliquen una respuesta mediada a nivel espinal, lo que estaría de acuerdo con nuestros datos obtenidos en el *test* de la inmersión de la cola.

Existen numerosos datos en la bibliografía que apuntan la existencia de interacciones entre los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  en roedores adultos, y se ha hipotetizado que dichos receptores podrían coexistir en un complejo receptor opioide (Heyman y col. 1989ab, Kamei y col. 1992, Leander y col. 1988, Negri y col. 1995, Porreca y col. 1987b,

Rothman y col. 1984). En este estudio hemos observado que el bloqueo funcional de los receptores  $\delta$  durante el período predestete bloqueó la respuesta antinociceptiva producida por alfentanil -agonista selectivo  $\mu$ - en ratas macho predestete de 20 días de edad, lo que sugiere que podría existir este tipo de interacción entre receptores  $\mu$ - $\delta$  durante el período en que ambos receptores se encuentran en rápido desarrollo.

Numerosos estudios farmacológicos sugieren la participación de agonistas  $\delta$  endógenos y exógenos en la potenciación de procesos antinociceptivos mediados por receptores  $\mu$  (Heyman y col. 1989ab, Negri y col. 1995, Porreca y col. 1987b). Los avances realizados en las técnicas de Biología Molecular, han permitido explorar las interacciones entre los distintos tipos de receptores opioides utilizando ratones *Knockout* para un determinado receptor. Así, se ha encontrado una reducción en el efecto antinociceptivo producido por agonistas  $\delta$ , en ratones *Knockout* para el receptor  $\mu$  (Matthes y col. 1998, Sora y col. 1997a). Mientras unos encuentran este efecto cuando la analgesia se valora en el *test* de la inmersión de la cola y no cuando se utiliza el *test* de la placa caliente (Matthes y col. 1998), otros lo encuentran tanto en este último *test* como en el *tail-flick* (Sora y col. 1997a). En ambos estudios se pone de manifiesto una cooperatividad  $\mu/\delta$  en la analgesia opioide. Nuestros resultados apoyan esta teoría, así, el bloqueo funcional crónico de los receptores  $\delta$  mediante naltrindol durante el período postnatal, podría haber prevenido un posible efecto modulador de los agonistas endógenos  $\delta$  sobre los receptores  $\mu$ , lo que explicaría la inhibición de la acción antinociceptiva del alfentanil.

De acuerdo con lo encontrado por otros autores (Crook y col. 1992, Su y col. 1998), en estudios realizados en nuestro grupo, hemos comprobado que una inyección aguda de 1 mg/kg de naltrindol, dosis que bloquea los receptores  $\delta$  sin afectar a los  $\mu$  (Crook y col. 1992, Kitchen y Pinker 1990, Muhammad y Kitchen 1993a) previa a la de alfentanil, no antagonizó la analgesia inducida por este compuesto. Sin embargo, la administración de 1 mg/kg de naloxona, dosis a la que este compuesto presenta una mayor afinidad por los

receptores  $\mu$  (Jackson y Kitchen 1989a), antagonizó la antinocicepción mediada por alfentanil. Estos resultados sugieren la actuación específica del naltrindol sobre los receptores  $\delta$ .

En cuanto a la posible base molecular de las interacciones funcionales observadas, en estudios preliminares hemos observado que un tratamiento con naltrindol idéntico al utilizado en este estudio, no parece producir modificaciones importantes en los receptores  $\mu$  y  $\delta$  encefálicos (Goody y col. 1998). En relación con cambios compensatorios en subtipos de receptores opioides que pudieran estar implicados en la cooperatividad funcional entre receptores, estudios de autorradiografía realizados en ratones *Knockout* no encuentran cambios importantes en la expresión de receptores, aunque se han obtenido indicaciones de una modesta regulación a la baja de receptores  $\delta$  y  $\kappa$  en animales deficientes en receptor  $\mu$ , que afectan a ciertas regiones específicas (Kitchen y col. 1997). Actualmente, estamos estudiando en colaboración con el Profesor Kitchen, posibles efectos de nuestro tratamiento con naltrindol sobre receptores opioides espinales. En todo caso, las interacciones funcionales  $\mu$ - $\delta$  podrían afectar a la sensibilidad de los receptores y/o a otros componentes moleculares implicados en la señal de transducción.

Mientras que se ha visto que los agonistas  $\kappa$  producen antinocicepción frente a estímulos mecánicos y químicos, en diversos estudios se ha señalado su falta de eficacia en la producción de antinocicepción frente a estímulos térmicos en animales adultos (Hunter y col. 1990, McLaughlin y col. 1995, Schmauss 1987, Tyers 1980). Sin embargo esto no ocurre en animales neonatales. Así, se ha observado que los agonistas  $\kappa$  PD 117302, U69593 y CI-977 producen una clara antinocicepción en el test de la inmersión de la cola, en ratas de 5 y 10 días de edad (Kitchen y col. 1995a), el U50,488 produce antinocicepción en animales de 10 días (Kehoe y Boylan 1994) y el CI-977 es efectivo en el test de *tail-flick* en ratas de 3 días de edad (McLaughlin y col. 1995). Nuestros resultados indican que el CI-977, a la dosis de 50  $\mu$ g/kg, produjo antinocicepción en animales de 20 días. En general, estos

datos sugieren que la antinocicepción frente a estímulos térmicos mediada por receptores  $\kappa$  podría ser particularmente importante en los neonatos, en comparación con los animales adultos, y podría tratarse de un mecanismo protector biológico durante el desarrollo temprano.

En contraste con los resultados obtenidos con el alfentanil, la antinocicepción inducida por el agonista  $\kappa$  no fue reducida significativamente por el tratamiento neonatal con naltrindol. En la literatura relativa a la posible cooperatividad entre receptores opioides existen pocas indicaciones acerca de las interacciones  $\delta/\kappa$ . En un trabajo realizado recientemente, sí se han encontrado indicios de una interacción funcional entre los receptores  $\delta$ - $\kappa$  en ratón, ya que se han encontrado pequeños incrementos en la densidad de receptores cerebrales  $\delta$  en regiones no corticales de ratones *Knockout* para el receptor  $\kappa$  (Slowe y col. 1999). Nuestros resultados sugieren que existe una interacción entre los receptores  $\mu$  y  $\delta$ , pero no entre los  $\kappa$  y  $\delta$  en la mediación de la nocicepción, en ratas macho predestete.

En algunos estudios se observó que agonistas  $\mu$  como la morfina y el DAGO indujeron depresión comportamental en ratas neonatales de 5-20 días de edad, cuando los animales fueron testados en condiciones similares a las del alojamiento habitual (Jackson y Kitchen 1989a). Por el contrario, los resultados de nuestro trabajo indican que el agonista selectivo  $\mu$  alfentanil causó un incremento en la deambulación interna y la postura erguida en el campo abierto (tablero sin agujeros), un *test* que supone un grado moderado de estrés. Dada la bien conocida tendencia tigmotáctica de la rata, un incremento en la deambulación interna es indicativo de un descenso en la emotividad o ansiedad de los animales y la postura erguida es un parámetro relacionado con su actividad exploratoria (De Cabo y col. 1995). Así, los resultados sugieren que el alfentanil disminuyó los niveles de emotividad/ansiedad de los animales e incrementó la actividad exploratoria de los mismos, lo que coincide con estudios previos que muestran cómo sustancias opioides pueden

facilitar el comportamiento exploratorio del animal en ambientes novedosos o aversivos (Van Abeelen 1989). Las respuestas a alfentanil en el campo abierto no se vieron afectadas por el tratamiento con el antagonista  $\delta$ , a diferencia de los resultados obtenidos en el *test* nociceptivo donde como ya hemos dicho se encontró una interacción entre el tratamiento neonatal con naltrindol y el tratamiento agudo con alfentanil. Estos resultados sugieren que los receptores  $\mu$  y  $\delta$  que presumiblemente interactúan en la modulación de la antinocicepción podrían ser, al menos en parte, diferentes de los que están implicados en este tipo de respuestas comportamentales en el campo abierto. En un estudio realizado por Bardo y sus colaboradores se encontró que la administración crónica de naloxona (1mg/kg, dos veces al día) durante los primeros 21 días de vida, produjo incrementos significativos en los sitios de unión de [ $^3$ H] naloxona en diversas áreas del sistema nervioso central, un día después de la finalización del tratamiento, y que este efecto se vio acompañado de un incremento en la eficacia antinociceptiva de la morfina, pero no afectó a la hipoactividad producida por este compuesto (Bardo y col. 1983b). Estos datos podrían sugerir una implicación diferencial de los receptores  $\mu$  (o de distintos subtipos de receptores  $\mu$ ), en las respuestas antinociceptivas y comportamentales, lo que avalaría nuestra interpretación indicada más arriba respecto a los diferentes resultados encontrados en las respuestas antinociceptivas y de actividad al alfentanil, en animales tratados crónicamente con naltrindol.

En estudios en los que se han investigado las respuestas de ratas neonatales a agonistas  $\kappa$ , se ha visto que estos compuestos inducen hiperactividad en ratas de 3, 5, 10 y 15 y 17 días de edad (Jackson y Kitchen 1989a, Kehoe y Boylan 1994, McDougall y col. 1999, McLaughlin y col. 1995). Por el contrario, los agonistas  $\kappa$  y en particular el CI-977, típicamente inducen hipoactividad en ratas y ratones maduros (Castellano y Pavone 1987, Coltro Campi y Clarke 1995, Di Chiara e Imperato 1988, Hunter y col. 1990, Jackson y Cooper 1986, McLaughlin y col. 1995, Mucha y Herz 1985). Nuestros resultados indican que

el CI-977 indujo una marcada hipoactividad en el campo abierto en animales de 20 días de edad, lo cual se vió reflejado por un descenso significativo en la deambulación externa y total, un descenso de aproximadamente un 90% en la frecuencia de postura erguida, y una disminución significativa en el *grooming*. Estos efectos no se vieron afectados por el tratamiento neonatal con naltrindol. En estudios anteriores (Jackson y col. 1989a) se encontró que el U50,488H suprimió el *grooming* y el comportamiento roedor en ratas de 20 días de edad, mientras la actividad locomotora apenas se vió afectada. Otros estudios indican que los efectos del CI-977 sobre la actividad de animales de 21 días de edad parecen ser bifásicos, de manera que aparecen algunos efectos estimuladores a dosis bajas (10 µg/kg) y descensos significativos en la actividad en el campo abierto a dosis altas (1000 µg/kg) (McLaughlin y col. 1995). Aunque esta dosis es mucho mayor que la utilizada en nuestro estudio, parece que entre los días 20-21 de edad hay cambios claros en los efectos del CI-977 sobre la actividad de los animales, cuando se comparan con los efectos producidos en ratas más jóvenes. Se ha propuesto que este hecho podría ser el reflejo de una transición, durante el desarrollo, en el sustrato que subyace a los efectos del CI-977 sobre la actividad (McLaughlin y col. 1995). Algunos autores han confirmado el importante papel que el proceso del destete parece jugar en el desarrollo del receptor opioide  $\delta$  (Kitchen y col. 1995b). Resultaría de especial interés conocer la posible influencia de este proceso en el desarrollo de las respuestas comportamentales mediadas por agonistas kappa, ya que podría justificar los diferentes efectos encontrados a las distintas edades.

Concluyendo, el bloqueo funcional del receptor opioide  $\delta$  naltrindol durante los primeros 19 días de vida postnatal, mediante la administración de naltrindol, bloqueó la respuesta antinociceptiva a alfentanil, pero no afectó a la antinocicepción inducida por CI-977, en ratas macho predestete. Los resultados sugieren una interacción funcional entre los receptores  $\mu$  y  $\delta$  durante el período postnatal pero no entre los receptores  $\delta$  y  $\kappa$  en la mediación de las respuestas antinociceptivas medidas en el *test* de la inmersión de la cola,

sin embargo no se observa interacción entre receptores  $\delta$ - $\mu$  o  $\delta$ - $\kappa$  en la mediación de las respuestas comportamentales registradas en el campo abierto.

V.1.2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LAS RESPUESTAS ANTINOCICEPTIVAS AL AGONISTA  $\mu$  MORFINA. EFECTOS DE LA MANIPULACIÓN DE LOS ANIMALES. DIFERENCIAS SEXUALES.

## **RESULTADOS**

### *Latencias basales nociceptivas.*

El análisis de las respuestas basales al estímulo térmico reveló un efecto significativo de la manipulación postnatal ( $p < 0,001$ ). Las comparaciones *post-hoc* indicaron que los animales no manipulados de ambos sexos, mostraron latencias nociceptivas basales significativamente mayores comparados con los animales manipulados durante el período neonatal (Figura 5). En todos los grupos de tratamiento, las hembras presentaron latencias basales menores, es decir, una mayor sensibilidad al estímulo térmico, en comparación con los machos (Figura 5). No se encontró efecto significativo del tratamiento crónico con naltrindol ni interacción significativa entre el sexo y el tratamiento con naltrindol.

### *Respuestas antinociceptivas a morfina.*

El análisis de los cocientes de latencia (15 frente a 30 minutos), en los animales no manipulados inyectados con morfina, reveló una interacción significativa entre el sexo y el tiempo ( $p < 0,05$ ). El análisis *post-hoc* indicó que el efecto de la morfina se incrementó significativamente entre los 15 y los 30 minutos en los machos pero no en las hembras. De acuerdo con este resultado, los cocientes de latencias obtenidos a los 30 minutos de la administración de la droga fueron significativamente mayores en machos que en hembras ( $p < 0,05$ ) (Figura 6, zona superior). No se encontró interacción significativa sexo-tiempo en los grupos controles correspondientes inyectados con suero salino.

El Anova de dos vías realizado con las áreas bajo las curvas mostró un efecto significativo de la manipulación postnatal en machos ( $p < 0,05$ ), siendo los animales manipulados los que presentaron los valores menores (Figura 6, zona inferior). Una visión de los datos nos hace pensar que existe una interacción entre la manipulación y el tratamiento agudo pero esta interacción no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,17$ ). De hecho una comparación múltiple de las medias por Anova de una vía reveló diferencias significativas entre los animales tratados con morfina ( $p < 0,05$ ), pero no entre los controles inyectados agudamente con suero salino (Figura 6, zona inferior). Estos resultados indican que la manipulación redujo el efecto antinociceptivo de la morfina en machos. En estos animales no se encontró un efecto significativo de la administración crónica de naltrindol sobre la antinocicepción inducida por morfina. Ni la manipulación ni el tratamiento crónico con naltrindol indujeron efectos estadísticamente significativos sobre la antinocicepción inducida por morfina en hembras. Sin embargo, comparando en un análisis los grupos no manipulados con los grupos tratados con naltrindol, encontramos que las áreas bajo las curvas de las hembras tratadas con naltrindol fueron significativamente mayores que las correspondientes a los animales no manipulados ( $p = 0,01$ ). Aunque la interacción entre los factores no resultó estadísticamente significativa, una comparación múltiple de las medias por Anova de una vía mostró diferencias significativas entre los animales inyectados con morfina ( $p < 0,05$ ), pero no entre los inyectados de forma aguda con suero salino (Figura 6, zona inferior).

El posible antagonismo de la antinocicepción inducida por morfina por el pretratamiento con una inyección de naltrindol fue estudiado analizando únicamente los cocientes de latencia obtenidos a los 15 minutos de la administración de morfina (pico antinociceptivo). Los resultados indican que la administración aguda de naltrindol no antagonizó el efecto antinociceptivo de la morfina en los animales controles tratados neonatalmente con suero salino: Machos: salino agudo:  $1,15 \pm 0,10$ , morfina agudo:  $1,79 \pm$

0,22, naltrindol agudo + morfina agudo (n=7):  $2,61 \pm 0,45$ . Hembras: salino agudo:  $1,72 \pm 0,16$ , morfina agudo:  $3,14 \pm 0,53$ , naltrindol agudo + morfina agudo (n=7):  $3,95 \pm 0,38$ . Sin embargo en hembras tratadas neonatalmente con naltrindol, el efecto antinociceptivo de la morfina fue reducido ligeramente por el pretratamiento con naltrindol de forma aguda: salino agudo:  $1,92 \pm 0,19$ , morfina agudo:  $3,91 \pm 0,57$ , naltrindol agudo + morfina agudo (n=7):  $3,40 \pm 0,42$ , lo que se deduce de la ausencia de diferencias significativas entre el grupo control inyectado de forma aguda con suero salino y el grupo inyectado de forma aguda con NTI+MF.

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL Y LA MANIPULACIÓN SOBRE LAS LATENCIAS NOCICEPTIVAS BASALES EN ANIMALES NEONATALES.  
TEST DE INMERSIÓN DE LA COLA.

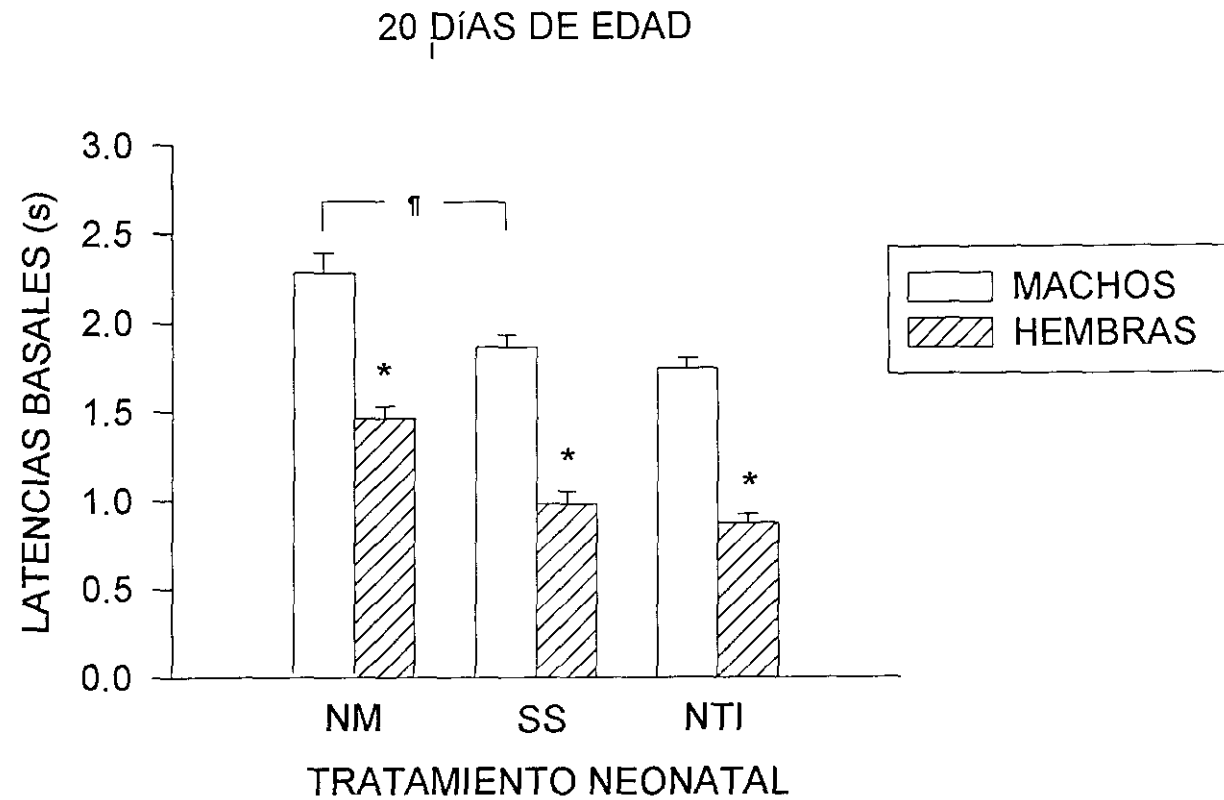


Figura 5. Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. de 15-30 animales. NM: no manipulados. SS: suero salino. NTI: naltrindol.  
\*  $p < 0.05$  frente al grupo de machos. ¶  $p < 0,05$  frente a los controles no manipulados.

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL Y LA MANIPULACIÓN (DÍAS 0-19) SOBRE LA ANTINOCICEPCIÓN INDUCIDA POR MORFINA EN ANIMALES NEONATALES (20 DÍAS). TEST DE INMERSIÓN DE LA COLA.

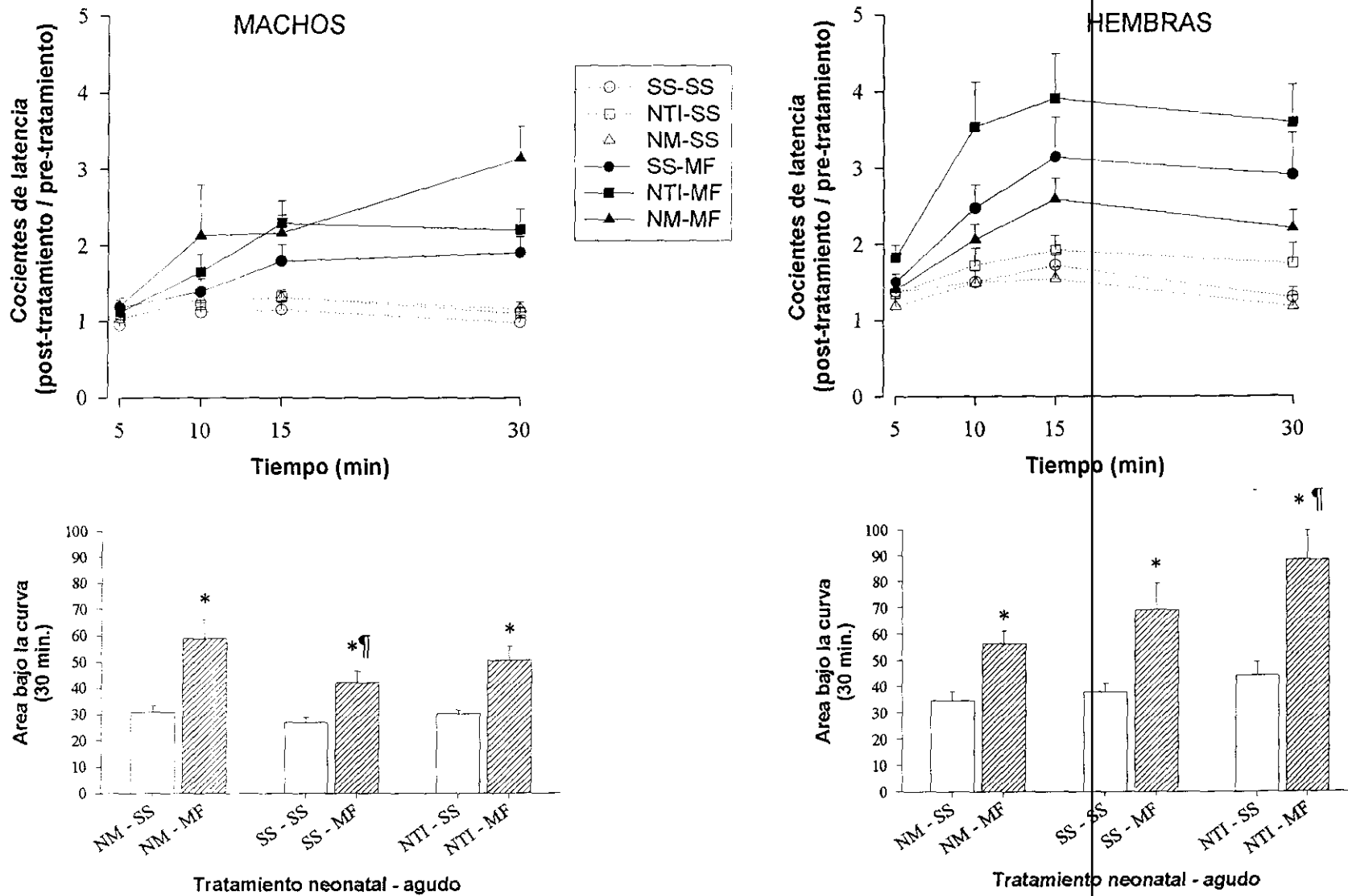


Figura 6. Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. de 8-12 animales. SS: suero salino, NTI: naltrindol, NM: no manipulados, MF: morfina. \* $p < 0,05$  frente a los grupos tratados con suero salino de forma aguda; ¶  $p < 0,05$  frente a los grupos no manipulados tratados con morfina.

## DISCUSIÓN

Existen evidencias que indican la existencia de diferencias sexuales en la nocicepción y las respuestas antinociceptivas a morfina en roedores adultos (Bodnar y col. 1988, Cicero y col. 1997). Los resultados de este trabajo muestran que, en todos los grupos de tratamiento neonatal, las hembras presentaron mayor sensibilidad al estímulo térmico comparadas con los machos. Estos datos apoyan estudios previos que demuestran la existencia de diferencias sexuales en respuesta a estímulos nocivos. Mientras unos autores encuentran una mayor sensibilidad al dolor en los machos adultos frente a las hembras en el *test* de la inmersión de la cola en agua caliente (Molina y col. 1994), otros observan de acuerdo con nuestros resultados que las hembras adultas presentan una sensibilidad mayor a los estímulos nocivos que los machos (Bodnar y col. 1988, Fillingim y Maixner 1995). Nuestros resultados extienden este último descubrimiento a ratas neonatales.

Las ratas y ratones hembra adultas manifiestan una antinocicepción inducida por morfina significativamente menor que los machos (Bodnar y col. 1988, Cicero y col. 1997). Cicero y sus colaboradores encontraron que la antinocicepción inducida por morfina valorada en tres pruebas nociceptivas (placa caliente, *tail-flick* y contracción abdominal) fue mayor en machos que en hembras (tanto en magnitud como en duración) (Cicero y col. 1996). Estas diferencias sexuales parecen ser un reflejo de diferencias inherentes en la sensibilidad del cerebro a la morfina, más que de una biodisponibilidad o un metabolismo de la morfina diferente en ambos sexos (Cicero y col. 1997). De acuerdo con estos datos, en nuestro trabajo, el efecto antinociceptivo de la morfina parece ser de mayor duración en los machos no manipulados que en las correspondientes hembras a la edad de 20 días. Se ha encontrado dimorfismo sexual en la densidad de receptores opioides  $\mu$  centrales, y algunos resultados sugieren que la dirección de estas diferencias sexuales en el hipotálamo y el cerebro entero podrían depender, al menos en parte, de la edad de los animales (De Cabo y col. 1992a, Rimanóczy y Vathy 1995).

Se ha informado de que diversas variables pueden afectar la expresión de diferencias sexuales en la potencia analgésica de la morfina, y se ha destacado la gran importancia del genotipo en este aspecto, de forma que se ha descubierto que mientras en unas cepas de ratón los machos son más sensibles a la morfina que las hembras, en otras ocurre exactamente lo contrario (Kest y col. 1999). Estos datos sugieren la importancia del genotipo y del sexo en la mediación de la analgesia inducida por morfina y justifica las contradicciones encontradas en algunas ocasiones en la literatura.

La capacidad de los estrógenos y la progesterona de modular la actividad antinociceptiva espinal puede ser, en parte, la responsable de las diferencias sexuales encontradas en respuesta a analgésicos (Dawson-Basoa y Gintzler 1997) ya que algunos estudios encuentran que la administración de andrógenos a ratas hembra, atenúa la diferente sensibilidad al dolor valorada en el *test* de la inmersión de la cola en agua caliente, encontrada entre ambos sexos (Molina y col. 1994). En nuestro caso, las diferencias sexuales en la respuesta a morfina en animales neonatales podrían ser atribuibles a la acción de los esteroides gonadales durante el período crítico de diferenciación sexual del cerebro, que en la rata ocurre durante el período perinatal.

De acuerdo con estudios previos (Alberti y col. 1999, Antelo y col. 1998), así como con otros estudios realizados en este trabajo (ver apartados V.1.1., V.4.1), la administración crónica de naltrindol no modificó las respuestas nociceptivas basales valoradas en el *test* de la inmersión de la cola en agua caliente. Como ya hemos discutido (ver discusión del estudio V.1.1) estos datos sugieren que el receptor  $\delta$  no juega un papel importante en el establecimiento de la sensibilidad al dolor.

El estrés de la manipulación postnatal incrementó la sensibilidad a estímulos térmicos, tanto en machos como en hembras, como podemos comprobar por las latencias basales disminuidas en animales manipulados. Estos resultados contrastan con datos previos, que indican que una manipulación neonatal (retirada temporal de la madre para la

inyección de los *pups* con suero salino s.c. desde el día 2 al 19 postnatal) incrementó los umbrales nociceptivos en el *test* de *tail-flick* en ratones de 30 días de edad (D'Amore y col. 1993). Los diferentes resultados pueden ser atribuibles a las diferentes especies empleadas. De hecho, nuestros resultados parecen estar de acuerdo con datos previos que indican que el estrés crónico normalmente produce un vaciamiento de las rutas centrales opioides en ratas (Madden y col. 1977), lo cual podría conducir a unos umbrales nociceptivos reducidos en los animales manipulados.

Nuestros resultados indican que la manipulación postnatal redujo significativamente el efecto de la morfina en machos de 20 días de edad. En otros estudios se ha encontrado que la manipulación postnatal redujo el efecto antinociceptivo de la  $\beta$ -endorfina en ratones macho (D'Amore y col. 1993). Diversos procesos de manipulación estresante durante etapas postnatales tempranas inducen la liberación de  $\beta$ -endorfina por la hipófisis, en crías de rata (Iny y col. 1987). Se ha propuesto que los procedimientos de manipulación crónica podrían producir una repetida y exagerada liberación de  $\beta$ -endorfina endógena, que podría conducir a una capacidad de respuesta reducida a la  $\beta$ -endorfina exógena (D'Amore y col. 1993). La respuesta reducida a la morfina, en nuestros machos manipulados, podría atribuirse a fenómenos de tolerancia cruzada entre la morfina exógena y la  $\beta$ -endorfina endógena. Se conoce poco acerca de la posible influencia del sexo en los efectos de la manipulación sobre las respuestas antinociceptivas a opioides durante el período postnatal. Los resultados de este trabajo indican que la influencia del estrés de la manipulación sobre la antinocicepción inducida por morfina fue más marcada en machos que en hembras. Como veremos en otro estudio enmarcado en esta Tesis Doctoral (apartado V.2), el mismo proceso de manipulación neonatal previno el aumento de corticosterona en respuesta al estrés en machos, pero no modificó la respuesta de corticosterona al estrés en hembras. Teniendo en cuenta estos datos, apuntamos la existencia de diferencias sexuales en los efectos de la manipulación, tanto sobre las respuestas antinociceptivas mediadas por

opioides, como sobre las respuestas fisiológicas al estrés, en ratas neonatales, resultando los machos los más sensibles a dichos efectos. Este resultado también se ha observado en ratas adultas, donde se ha visto que los machos son más sensibles que las hembras a las consecuencias del estrés sobre la nocicepción y el contenido en  $\beta$ -endorfina en la sustancia gris periacueductal (Aloisi y col. 1994).

La mayoría de las interacciones entre los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  en la mediación de la antinocicepción han sido estudiadas principalmente en roedores adultos (Heyman y col. 1989ab, Kieffer 1999, Negri y col. 1995, Porreca y col. 1987b), mientras que existe poca información acerca de dichas interacciones en ratas neonatales. En un estudio enmarcado en esta Tesis ya hemos visto como el tratamiento crónico con naltrindol durante el período predestete bloqueó las respuestas antinociceptivas al agonista  $\mu$  selectivo alfentanil, en machos a la edad de 20 días (ver apartado V.1.1). Sin embargo, en un estudio previo vimos que no tuvo efecto en hembras de la misma edad (Antelo y col. 1998). Los presentes resultados indican que el mismo tratamiento con naltrindol no afectó significativamente las respuestas a morfina en machos de 20 días de edad, lo que parece estar de acuerdo con los resultados obtenidos en un estudio realizado en esta Tesis Doctoral (apartado V.3.) en el que la administración crónica de naltrindol no modificó el efecto de la morfina sobre las respuestas de vocalización a estímulos eléctricos en machos adultos. Por el contrario, el tratamiento crónico con naltrindol pareció modular positivamente las respuestas a morfina en hembras de 20 días de edad, posiblemente potenciando la influencia de la manipulación, dado que este procedimiento tendió a incrementar la antinocicepción inducida por morfina en este sexo. La comparación de este estudio (utilizando morfina) con los resultados que hemos obtenido utilizando alfentanil tanto en esta Tesis (apartado V.1.1.) como en estudios previos (Antelo y col. 1998), pone de manifiesto que los efectos moduladores del tratamiento neonatal crónico con naltrindol sobre la antinocicepción mediada por receptores  $\mu$  opioides, dependen tanto del sexo como del agonista  $\mu$  utilizado. En ratones machos adultos, se ha

observado que la administración del agonista  $\delta$  DPDPE potenció los efectos antinociceptivos producidos por los agonistas  $\mu$  morfina y normorfina, pero sin embargo las respuestas antinociceptivas a otros agonistas  $\mu$  como el sufentanil, meperidina, metadona, DAMGO y PLO17 no se vieron afectadas (Heyman y col. 1989b). Utilizando una aproximación diferente se ha encontrado, sin embargo, que el sinergismo con DPDPE fue mayor utilizando DAMGO que utilizando morfina en ratas macho adultas (Malmberg y Yaksh 1992, Traynor y Elliot 1993). Estos resultados han conducido a proponer que podrían existir diferentes subtipos de receptores  $\mu$  que podrían corresponder a  $\mu_{\text{complejo}}$  y  $\mu_{\text{no-complejo}}$ , los cuales podrían ser diferencialmente activados por diferentes agonistas opioides  $\mu$  y, correspondientemente, modulados de diferente manera por agonistas  $\delta$  endógenos o exógenos (Heyman y col. 1989b). De acuerdo con esta interpretación, los diferentes efectos del tratamiento crónico con naltrindol sobre las respuestas antinociceptivas a alfentanil (apartado V.1.1., Antelo y col. 1998) y la morfina, podrían apoyar la implicación de diferentes subtipos de receptores  $\mu$  opioides. Por otra parte, se podría pensar que los diferentes resultados reflejasen diferencias en la eficacia de los dos agonistas  $\mu$  y podrían estar relacionados con fenómenos de acoplamiento u ocupación de receptores alterados. Esta última explicación parece estar apoyada por datos recientes obtenidos de ratones deficientes en receptores  $\mu$  opioides. De hecho, este tipo de estudios no ha revelado la existencia de diferentes genes que codifiquen para diferentes subtipos de receptores opioides  $\mu$ , y se ha sugerido que la heterogeneidad farmacológica podría derivarse de una respuesta variable del receptor  $\mu$ , en función del ligando que interactúa con él o los efectores intracelulares que entran en funcionamiento (Kieffer 1999).

Se ha propuesto que las acciones moduladoras de los agonistas  $\delta$  sobre la antinocicepción inducida por morfina, podrían estar mediadas a través de receptores opioides  $\delta$ , ya que la modulación, pero no el efecto directo mediado por  $\mu$ , puede ser antagonizado por antagonistas opioides  $\delta$  (Heyman y col. 1989b, Porreca y col. 1992).

Nuestros resultados indican que el efecto directo de la morfina no fue reducido por el pretratamiento con una inyección aguda de naltrindol en ninguno de los sexos, lo que apoya datos obtenidos previamente que indican que la dosis de naltrindol utilizada en nuestro estudio antagoniza selectivamente los receptores  $\delta$ , sin afectar a los  $\mu$  (Crook y col. 1992). Otros autores, en estudios realizados con ratón, tampoco encuentran reducción de la antinocicepción inducida por morfina tras la administración de naltrindol (2,5 mg/kg) en el mismo *test* nociceptivo (Matthes y col. 1998) ni tras la inyección de dosis aún mayores (3 mg/kg) en la placa caliente (Narita y col. 1993). Sin embargo, encontramos que el pretratamiento con una inyección aguda de naltrindol, redujo la acción moduladora positiva del tratamiento crónico con naltrindol sobre la respuesta a morfina de hembras de 20 días de edad. Estos datos sugieren que la modulación positiva de la antinocicepción por morfina inducida por la administración crónica de naltrindol fue mediada por el receptor opioide  $\delta$ .

En conclusión, los resultados indican que el estrés de manipulación y la administración crónica de naltrindol durante el periodo predestete afectaron a las respuestas antinociceptivas a morfina en ratas neonatales, y ponen de manifiesto la importante influencia del sexo en estos efectos.

## V.2. IMPLICACIONES DEL RECEPTOR $\delta$ EN LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADRENOCORTICAL DURANTE EL PERÍODO NEONATAL. EFECTOS DEL SEXO Y DE LA MANIPULACIÓN.

EFECTOS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL Y LA MANIPULACIÓN SOBRE LA RESPUESTA DE CORTICOSTERONA AL ESTRÉS.

### **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos directamente en esta Tesis Doctoral son todos los referidos a machos, así como los de hembras no manipuladas. Como ya se ha mencionado en la sección de objetivos, los datos obtenidos en hembras manipuladas fueron parte de una Tesina que fue realizada en el seno de nuestro grupo de investigación y presentada recientemente (Antelo 1998). Los experimentos correspondientes a ambos trabajos se realizaron paralelamente y siguiendo el mismo protocolo. Con objeto de facilitar una visión de conjunto adecuada, se presentan los resultados globalmente, tal como han sido publicados (Fernández y col. 1999).

El análisis de los datos reveló que los niveles basales de corticosterona fueron significativamente mayores en las hembras controles no manipuladas que en los machos correspondientes ( $p < 0,05$ ) (Figura 7). Los niveles basales de corticosterona fueron significativamente menores en el grupo de hembras inyectadas neonatalmente con suero salino que en el grupo de hembras no manipuladas ( $p < 0,05$ ), lo que indica que la manipulación redujo los niveles basales de corticosterona en este sexo. Por el contrario, la manipulación no tuvo un efecto significativo sobre los niveles basales de corticosterona en machos (Figura 7). Los grupos controles inyectados neonatalmente con suero salino no difirieron significativamente de los tratados con naltrindol con respecto a la concentración basal de corticosterona, de donde se

deduce que el tratamiento neonatal con el antagonista  $\delta$  no afectó significativamente a esta variable en ningún sexo (Figura 7).

Según lo esperado, en los animales controles no manipulados los niveles de corticosterona aumentaron significativamente después del estrés de natación ( $p < 0,05$ ). Asimismo se observó un incremento significativo en los niveles hormonales después del estrés en hembras inyectadas con suero salino ( $p < 0,05$ ). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de corticosterona basales y post-estrés en los machos inyectados con suero salino, lo que indica que la manipulación previno el aumento de corticosterona inducido por el estrés sólo en este sexo (Figura 7).

En hembras se encontró un efecto significativo del tratamiento neonatal con naltrindol: así como, según se ha expuesto, en las hembras no manipuladas y las tratadas neonatalmente con suero salino el protocolo de estrés por natación indujo un incremento significativo en la concentración sérica de corticosterona, en las hembras tratadas neonatalmente con naltrindol este incremento no se produjo (Figura 7).

# EFFECTOS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL Y LA MANIPULACIÓN (DÍAS 0-19) SOBRE LA RESPUESTA DE CORTICOSTERONA AL ESTRÉS. 25 DÍAS DE EDAD

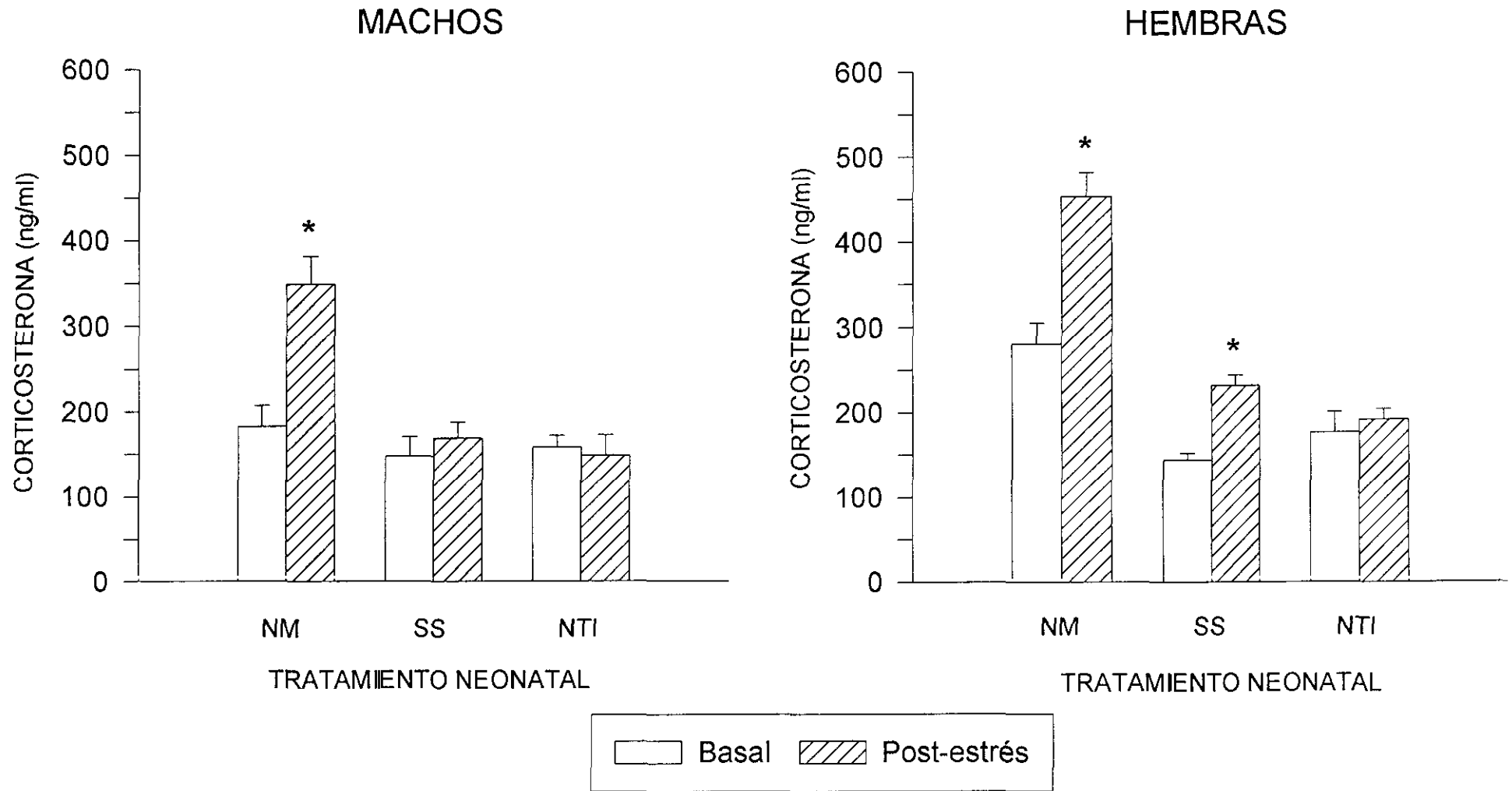


Figura 7. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 8-11 animales.  
SS: suero salino; NTI: naltrindol; NM: no manipulados.  
\* $p < 0,05$  frente a los niveles basales correspondientes

## **DISCUSIÓN**

Nuestros resultados indican que existen diferencias sexuales en los niveles basales de corticosterona en ratas de 25 días de edad, ya que las hembras presentan niveles más altos que los machos. En estudios previos se ha señalado la existencia de dimorfismo sexual en la función del eje HHA en la rata (Viveros y col. 1988). Diversos estudios indican que el eje HHA es más activo en hembras que en machos tanto en condiciones basales, como en respuesta a determinados estímulos estresantes como la restricción (Kant y col. 1983). En nuestro estudio efectivamente, unos niveles basales superiores en hembras pueden ser indicativos de un eje HHA más activo en este sexo.

La elevación de los niveles de hormona inducidos por el estrés, encontrados en los animales controles no manipulados, confirma que a los 25 días de edad existe en la rata una respuesta adrenocortical al estrés significativa, lo que también han confirmado otros autores (Bailey y Kitchen 1987).

En cuanto a los efectos de la manipulación durante el período predestete, observamos que afectó a los niveles basales de corticosterona únicamente en las hembras, de forma que dicha manipulación produjo una disminución significativa en este parámetro. Algunos autores también han encontrado niveles basales de ACTH y corticosterona disminuidos en animales de 14 días que fueron manipulados durante la infancia, frente a los no manipulados (Walker y Aubert 1988). Los autores explican que estas diferencias pueden reflejar una mayor susceptibilidad de las ratas no manipuladas frente al pequeño estímulo de manipulación que precede al sacrificio.

Asimismo, observamos que la manipulación durante el período predestete previno, en los machos, el esperado incremento en la concentración de corticosterona tras el estrés de natación pero, sin embargo, no afectó la respuesta de corticosterona inducida por el estrés en las hembras. Nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que encontraron que la manipulación neonatal indujo una reducción en la reactividad

adrenocortical a partir de los 14 días de edad. A esta edad y más tarde, la secreción de ACTH frente al estrés estuvo marcadamente reducida en los animales manipulados cuando se comparaba con los no manipulados (Walker y Aubert 1988). Nuestros resultados también concuerdan con numerosos estudios del efecto de la manipulación neonatal sobre la actividad adrenocortical en ratas adultas, en los que se encuentra una secreción disminuida de ACTH y corticosterona en respuesta al estrés en las ratas manipuladas (Durand y col. 1998, Meaney y col. 1989, Nuñez y col. 1996, Smythe y col. 1996, Steimer y col. 1998, Vallee y col. 1997). Por otro lado estudios previos han demostrado que diversos tratamientos en la infancia aceleran la maduración del sistema hipófiso-adrenal (para revisión ver Gray 1991, Iny y col. 1987). En nuestro trabajo la falta de respuesta de corticosterona encontrada en los machos inyectados con salino parece indicar la tendencia opuesta, esto es, que la manipulación produce un posible alargamiento en el período de hiporrespuesta al estrés. Los diferentes resultados obtenidos en otros trabajos podrían ser atribuibles a diferentes tipos y/o períodos de manipulación, diferencias en el tipo e intensidad del estrés utilizado para activar la respuesta adrenocortical etc... Nuestros resultados apuntan la posible importancia de todas estas variables, la existencia de efectos de la manipulación sobre la respuesta de corticosterona al estrés en ratas neonatales y de diferencias sexuales en los efectos de dicha manipulación.

En general, en la rata se ha observado que la administración aguda de agonistas  $\mu$ ,  $\delta$ , y  $\kappa$  opioides incrementa los niveles plasmáticos de corticosteroides (Ferri y col. 1982, González y col. 1991,1994, Guaza y col. 1979, Hayes y Stewart 1985) y potencia los incrementos en su secreción que ocurren en respuesta al estrés (Buckingham 1982) en ratas adultas. Se sugiere, que la acción de estos opioides es mediada por receptores opioides específicos en el hipotálamo. Unos autores señalan que la actividad moduladora de los agonistas opioides sobre el eje HHA está ausente o al menos severamente reducida en neonatos hasta aproximadamente los 45 días de edad (Bailey y Kitchen 1987), mientras que

otros han observado un control significativo de la función del eje HHA por opioides en ratas de 10 días de edad, de forma que agonistas  $\mu$  y  $\kappa$  produjeron aumentos en la secreción de ACTH y corticosterona. Así, existiría un control opioide del eje HHA durante el desarrollo postnatal temprano, incluso antes del comienzo del período de hiporreactividad al estrés (Adamson y col. 1991).

En nuestro estudio el tratamiento crónico con naltrindol, no modificó significativamente la concentración basal de corticosterona en ningún sexo. Sin embargo, en hembras se observó un claro efecto del tratamiento con naltrindol sobre los niveles hormonales registrados tras el estrés. De hecho, este grupo no mostró un incremento significativo en los niveles de corticosterona tras el estrés producido por la natación. Estos resultados indican que el bloqueo funcional del receptor opioide  $\delta$  durante el período predeste afecta considerablemente la reactividad adrenocortical a un tipo de estrés en el que está claramente implicado el sistema opioide, y que dicho receptor puede jugar un importante papel modulador de la actividad del eje HHA bajo condiciones estresantes en ratas jóvenes. Estudios previos han sugerido que más que los receptores  $\delta$ , son los receptores opioides  $\mu$  los que están implicados en la regulación de la respuestas de corticosterona al estrés en roedores adultos (Degli Uberti y col. 1995, Hart y col. 1985, Kitchen y col. 1984). En la respuesta de corticosterona al estrés podrían estar implicados diferentes tipos de receptores opioides, dependiendo del estadio del desarrollo. De hecho, esto parece ser cierto en la analgesia inducida por estrés mediada por opioides (Antelo y col. 1998). En estudios previos de nuestro grupo de investigación, encontramos que el mismo tratamiento con naltrindol produjo una reducción en la respuesta antinociceptiva inducida por el mismo tipo de estrés en hembras de 25 días (Antelo y col. 1998). Este resultado, junto con la reducción significativa en la respuesta de corticosterona al estrés observada en nuestras hembras tratadas con naltrindol, nos llevan a sugerir que la integridad de la función del receptor opioide  $\delta$  podría ser necesaria para la expresión de

respuestas adaptativas funcionales y comportamentales al estrés en ratas neonatales. Además, la respuesta de corticosterona al estrés parece ser un válido correlato neuroendocrino de la analgesia inducida por estrés en ratas hembras de 25 días de edad.

En conclusión, la manipulación neonatal disminuyó los niveles basales hormonales en hembras y previno la elevación de corticosterona en respuesta al estrés en machos de 25 días de edad, indicando la existencia de diferencias sexuales en los efectos de la manipulación. El tratamiento crónico con naltrindol durante el período predestete previno el aumento de corticosterona inducido por estrés en hembras de 25 días pero no en machos, lo que indica que el receptor opioide  $\delta$  podría jugar un papel importante en la modulación de la reactividad adrenocortical durante el período postnatal en hembras pero no en machos.

### V.3. ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE RECEPTORES $\mu$ - $\delta$ CON ESPECIAL ATENCIÓN A LA DIMENSIÓN AFECTIVA DEL DOLOR, EN ANIMALES ADULTOS.

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL SOBRE LAS RESPUESTAS ANTINOCICEPTIVAS AL AGONISTA  $\mu$  MORFINA.

#### **RESULTADOS**

##### *Respuestas basales.*

Se analizaron los datos de todos los animales incluidos en el estudio mediante un *test* de Student. Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento crónico con naltrindol no afectó significativamente las respuestas basales (animales inyectados con suero salino, n=27, retirada de la cola:  $0,65 \pm 0,03$ ; vocalización durante el estímulo:  $1,99 \pm 0,08$ ; vocalización post-descarga:  $3,1 \pm 0,2$ . Animales tratados con naltrindol, n=27, retirada de la cola:  $0,65 \pm 0,04$ ; vocalización durante el estímulo:  $1,85 \pm 0,09$ ; vocalización post-descarga:  $3,0 \pm 0,2$ ).

##### *Respuestas a morfina.*

El Anova de dos vías (factores: tratamiento crónico, tratamiento agudo) aplicado a los % MPE obtenidos de los diferentes grupos experimentales fue realizado para cada respuesta registrada (motora, vocalización durante la descarga y vocalización post-descarga). Estos análisis revelaron efectos significativos del tratamiento agudo para la vocalización durante el estímulo y la vocalización post-descarga ( $p_s < 0,0001$ ), sin embargo no se encontraron efectos significativos del tratamiento crónico con naltrindol o interacción entre factores para estas respuestas. El análisis *post-hoc* reveló diferencias significativas

entre los grupos controles inyectados con suero salino y los otros dos grupos inyectados con 2 ó 5 mg/kg de morfina, así como entre estos dos últimos grupos ( $p_s < 0,05$ ). Como muestran las Figuras 9 y 10, la morfina incrementó significativamente los umbrales para la vocalización durante el estímulo y la vocalización post-descarga de forma dosis dependiente, y se puede observar cómo la vocalización post-descarga fue la más sensible a los efectos del agonista  $\mu$  opioide. El tratamiento crónico con naltrindol no modificó estas respuestas, así se encontraron los mismos efectos en los animales inyectados con suero salino que en los tratados con el antagonista  $\delta$  opioide. La respuesta motora (retirada de la cola) no fue afectada significativamente ni por la administración crónica de naltrindol ni por ninguna de las dosis de morfina utilizadas en este estudio (Figura 8).

ESTIMULACION ELÉCTRICA DE LA COLA  
RATAS MACHO ADULTAS  
TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL (8 DÍAS)  
RESPUESTA A MORFINA  
RESPUESTA MOTORA

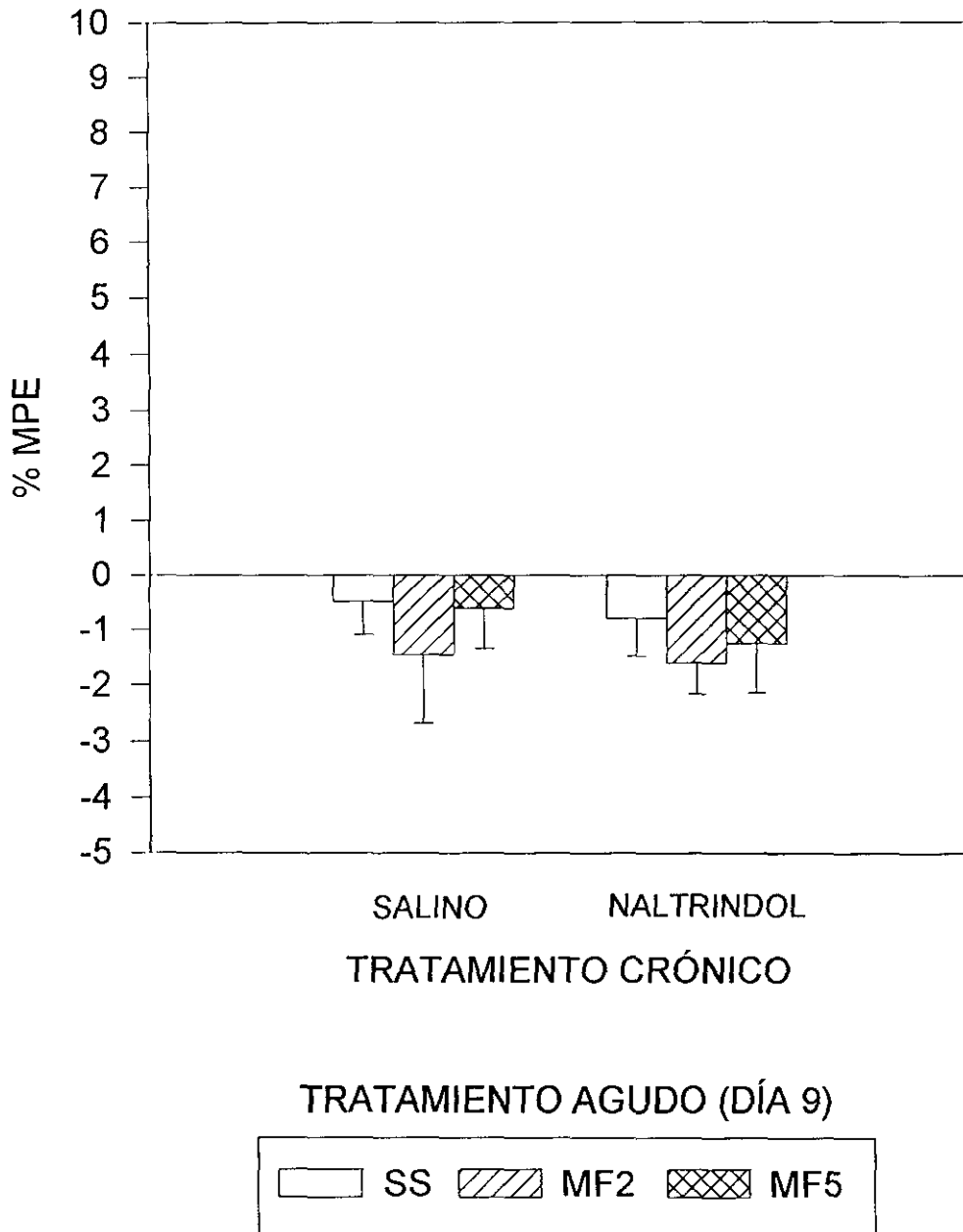


Figura 8. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 8-10 animales.  
SS: suero salino; MF2: morfina 2 mg/kg; MF5: morfina 5 mg/kg.

**ESTIMULACION ELÉCTRICA DE LA COLA  
RATAS MACHO ADULTAS  
TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL (8 DÍAS)  
RESPUESTA A MORFINA  
VOCALIZACIÓN DURANTE LA DESCARGA**

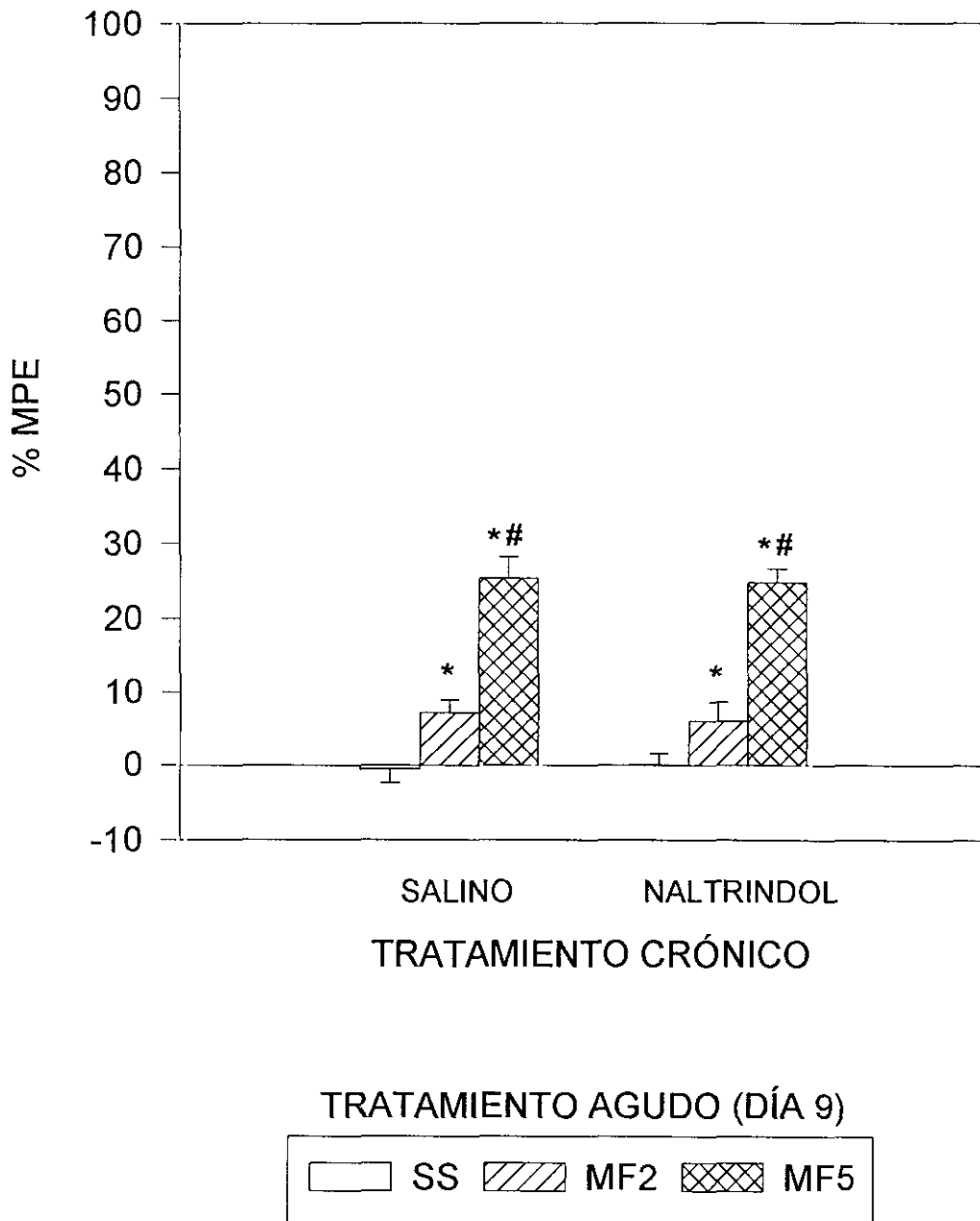


Figura 9. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 8-10 animales.  
 SS: suero salino; MF2: morfina 2 mg/kg; MF5: morfina 5 mg/kg.  
 \*  $p < 0,05$  frente a SS agudo. #  $p < 0,05$  frente a MF2.

**ESTIMULACION ELÉCTRICA DE LA COLA  
RATAS MACHO ADULTAS  
TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL (8 DÍAS)  
RESPUESTA A MORFINA  
VOCALIZACIÓN POST- DESCARGA**

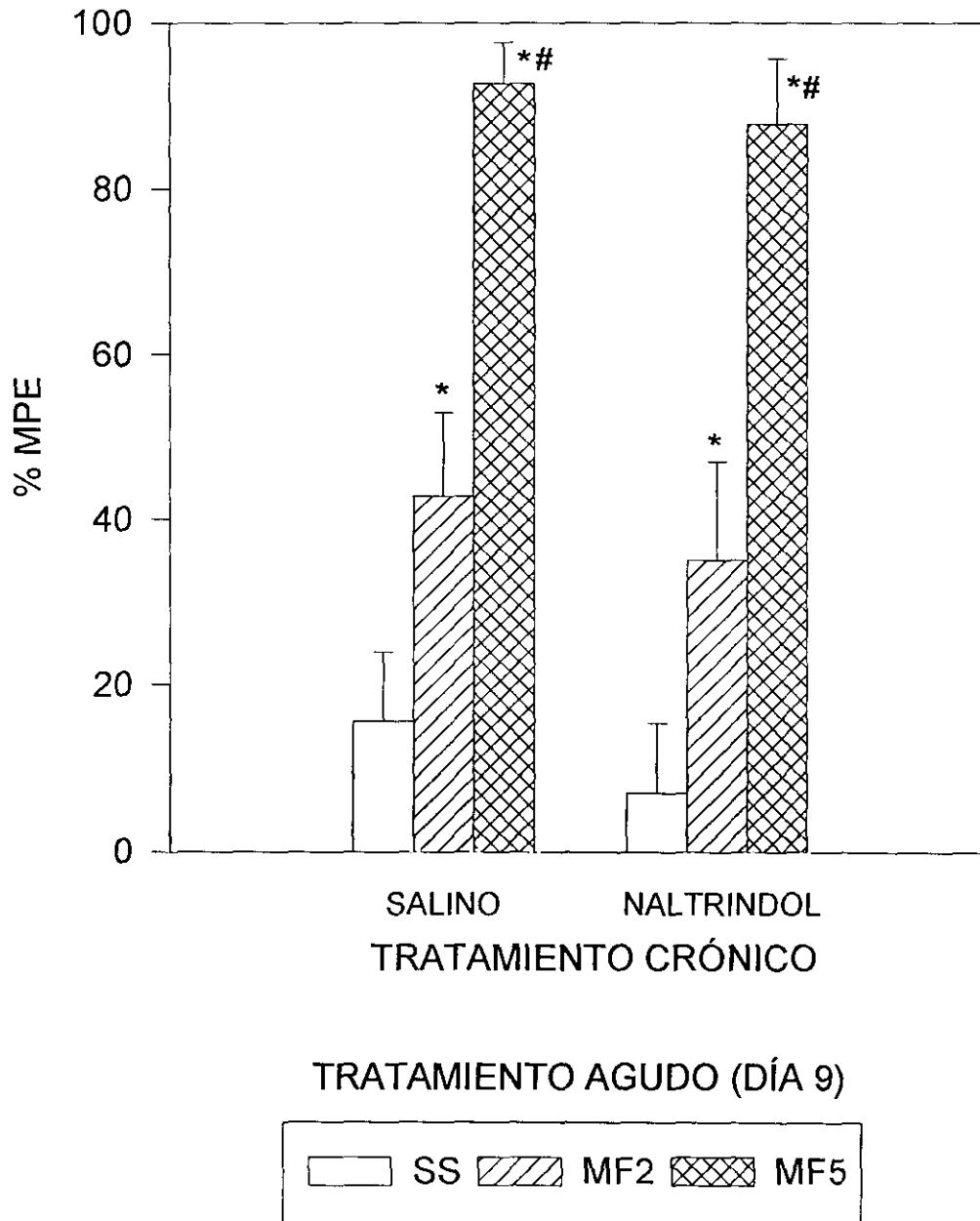


Figura 10. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 8-10 animales.  
 SS: suero salino; MF2: morfina 2 mg/kg; MF5: morfina 5 mg/kg.  
 \* $p < 0,05$  frente a SS agudo. #  $p < 0,05$  frente a MF2.

## DISCUSIÓN

La mayor parte de los datos disponibles en la literatura acerca de la interacción entre los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  hacen referencia a respuestas nociceptivas que implican reflejos coordinados a nivel espinal (Heyman y col. 1989a, Kamei y col. 1992, Negri y col. 1995, Porreca y col. 1987b), mientras que la dimensión afectiva del dolor ha sido menos estudiada. El *test* nociceptivo utilizado en este trabajo, permite la evaluación de tres respuestas nociceptivas que parecen estar relacionadas con sistemas reguladores del dolor, existentes a distintos niveles del sistema nervioso central. Así, la respuesta motora y la vocalización durante el estímulo se ha sugerido que son respuestas integradas a nivel de la médula espinal y el tronco cerebral caudal respectivamente, mientras la vocalización después de la descarga se considera mediada a nivel de diencefalo o estructuras límbicas y es un reflejo del componente afectivo del dolor (Borszcz 1995, Carrol y Lim 1960, Noble y col. 1997).

Nuestros resultados indican que el tratamiento crónico con naltrindol no modifica las respuestas basales registradas en el *test*. Estos datos sugieren que el receptor opioide  $\delta$  no juega un papel tónico en el establecimiento de la sensibilidad al dolor frente a la estimulación eléctrica, a ninguno de los niveles del sistema nervioso central en los que están integradas cada una de las respuestas registradas en la prueba. Estos resultados concuerdan con otros obtenidos previamente en estudios realizados en nuestro grupo de investigación (Alberti y col. 1999, Antelo y col. 1998) así como en esta Tesis (apartados V.1.1., V.1.2., V.4.1) en los que un tratamiento crónico con naltrindol a la misma dosis durante el período predestete no modificó las latencias basales nociceptivas en ratas neonatales, en el *test* de la inmersión de la cola.

En nuestro estudio, encontramos que la vocalización durante el estímulo y la vocalización postdescarga se vieron afectadas significativamente por la administración de morfina a las dosis de 2 y 5 mg/kg, y lo hicieron de manera dosis dependiente. Además, observamos que la vocalización postdescarga fue la respuesta más sensible a los efectos del agonista opioide  $\mu$ . Sin embargo, no se observaron efectos significativos de ninguna de las dosis de morfina sobre la respuesta motora. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en otros estudios en los que una dosis de morfina de 3 mg/kg afectó la respuesta de vocalización durante el estímulo y la respuesta más sensible fue la vocalización postdescarga, sin embargo la respuesta motora no se vio afectada (Valverde y col. 1996). Los mismos autores también encontraron, que la dosis más baja que indujo una inhibición significativa de la respuesta motora fue 9 mg/kg. Sin embargo, nosotros observamos en estudios piloto, que la dosis de 20 mg/kg de morfina no fue suficiente para afectar consistentemente la respuesta motora.

Utilizando los inhibidores de enzimas del metabolismo de las encefalinas RB 101 y RB 120, se encontró que sólo las dosis mayores aumentaron los umbrales para la respuesta motora, mientras que las dosis menores únicamente afectaron a la vocalización postdescarga (Noble y col. 1992, 1997). Así, la respuesta más sensible a morfina y a la modulación por enzimas del metabolismo de encefalinas es la vocalización postdescarga, integrada a nivel de estructuras neurales relacionadas con la dimensión emocional/afectiva del dolor, mientras el reflejo espinal parecer ser el menos afectado por estos compuestos. También se ha señalado, que el efecto antinociceptivo del RB 101 sobre la respuesta motora, fue revertido por la administración aguda de naltrindol, mientras que las respuestas de vocalización parecieron implicar la activación del receptor opioide  $\mu$  (Noble y col. 1992). En estudios anteriores en los que se utilizaron tratamientos crónicos con naloxona y agonistas opioides  $\kappa$ , se sugiere que la respuesta de vocalización frente a la estimulación eléctrica está mediada por receptores  $\mu$  sin la contribución de receptores  $\kappa$  (Millan y col.

1988, Millan 1989, 1990). Tomados en conjunto, estos datos ponen de manifiesto la importancia de los mecanismos supraespinales en las respuestas antinociceptivas mediadas por receptores opioides  $\mu$ . Nuestros datos también parecen estar de acuerdo con estudios previos, en los que las vocalizaciones ultrasónicas de ratas fueron consideradas una posible expresión de la respuesta afectiva al dolor. Comparando los efectos de la morfina sobre diversas respuestas a estímulos aversivos, se encontró que la morfina disminuyó específicamente y de manera dosis dependiente las frecuencias ultrasónicas altas, a dosis que no afectaron la retirada refleja de la cola ni el comportamiento social y motor. El efecto específico de la morfina sobre la vocalizaciones ultrasónicas, puede relacionarse con la descripción que hace el hombre de la analgesia inducida por morfina, en la que señala que la modulación del componente afectivo del dolor es más potente que la del componente sensorial (Haney y Miczek 1994).

La ausencia de efecto del tratamiento crónico con naltrindol sobre los efectos de la morfina en las respuestas de vocalización, indican que el receptor opioide  $\delta$  no está involucrado en los mecanismos supraespinales en los que estas respuestas parecen estar organizadas, y sugiere que no existe interacción  $\mu$ - $\delta$  en la modulación de las respuestas afectivas a la estimulación eléctrica dolorosa. Los presentes resultados concuerdan con los que de otros autores que han visto que en ratones *Knockout* para el receptor  $\mu$ , los agonistas  $\delta$  DPDPE y deltorfina II producen un menor efecto antinociceptivo en el *test* de la inmersión de la cola en agua caliente, mientras que no se encontró reducción significativa en la antinocicepción mediada por receptor  $\delta$  en el *test* de la placa caliente. Estos resultados pueden indicar que la cooperatividad  $\mu$ - $\delta$  en la antinocicepción opioide podría ocurrir a nivel espinal (Matthes y col. 1998). Además, como ya hemos comentado, en otros trabajos únicamente se han observado cambios sutiles en la expresión de receptores cerebrales  $\delta$  y  $\kappa$ , en animales *Knockout*  $\mu$  (Kitchen y col. 1997), lo que sugiere la ausencia de una

regulación compensatoria a la alta de los receptores  $\delta$  y  $\kappa$  en el cerebro de estos animales mutantes.

En los resultados expuestos en el apartado V.1.1. vimos como un tratamiento crónico neonatal con naltrindol bloqueó las respuestas antinociceptivas al agonista  $\mu$  alfentanil valoradas en el *test* de la inmersión de la cola, en ratas machos neonatales. Los diferentes resultados obtenidos en este otro estudio, podrían deberse a los diferentes estímulos dolorosos utilizados. De hecho, datos previos indican que las interacciones  $\mu$ - $\delta$  no están implicadas de la misma manera en la respuesta a diferentes estímulos dolorosos, posiblemente como consecuencia de mecanismos regionales selectivos (Matthes y col. 1998). También debe considerarse el hecho de que podrían activarse diferentes tipos de receptores opioides a diferentes estadios del desarrollo, como hemos demostrado en la antinocicepción inducida por estrés (Antelo y col. 1998). En estudios previos se ha encontrado que el agonista  $\delta$  DPDPE atenuó las vocalizaciones ultrasónicas emitidas por ratas hembras adultas durante interacciones agresivas, lo que sugiere un posible papel fisiológico de los receptores  $\delta$  en las reacciones afectivas y defensivas (Haney y Miczek 1995). Existen, al menos, dos posibles explicaciones para los diferentes resultados obtenidos en este trabajo. En primer lugar, el diferente tipo de estímulo utilizado para desencadenar las diferentes reacciones a situaciones aversivas, y en segundo lugar la diferencia en el sexo de los animales utilizados, hembras en el caso del informe arriba mencionado (Haney y Miczek 1995) y machos en nuestro estudio. De hecho está bien documentada en la literatura la importante influencia del sexo en la sensibilidad al dolor y la modulación del mismo (Alberti y col. 1999, Haney y Miczek 1994, Mogil y Belknap 1997, Romero y col. 1988), y estudios previos también apuntan la existencia de diferencias sexuales con respecto a la interacción entre tipos de receptores opioides, de forma que en esta Tesis ya hemos visto, que el tratamiento crónico con naltrindol bloqueó la respuesta antinociceptiva al agonista  $\mu$  alfentanil, en el *test* de la inmersión de la cola, en ratas macho

neonatales (apartado V.1.1), pero no lo hizo en hembras (Antelo y col. 1998); sin embargo en éstas moduló positivamente la respuesta antinociceptiva a morfina en el mismo *test* nociceptivo (apartado V.1.2).

En conclusión, el diseño experimental de este trabajo en el que se combina un tratamiento crónico con naltrindol, con la respuesta a morfina en el *test* de estimulación eléctrica de la cola, constituye una nueva aproximación al estudio de la interacción opioide  $\mu$ - $\delta$ . Los resultados indican que la respuesta de vocalización mediada a niveles supraespinales y que es un reflejo de la dimensión afectiva del dolor, está mediada específicamente por el receptor  $\mu$  sin una contribución aparente del receptor opioide  $\delta$ .

#### V.4. ESTUDIO SOBRE IMPLICACIONES FUNCIONALES DEL RECEPTOR $\delta$ EN EL DESARROLLO Y MODULACIÓN DE RESPUESTAS COMPORTAMENTALES Y FISIOLÓGICAS AL ESTRÉS. CORRELACIONES NEUROQUÍMICAS.

##### V.4.1. EFECTOS DE TRATAMIENTOS AGUDO Y CRÓNICO CON NALTRINDOL SOBRE RESPUESTAS NOCICEPTIVAS Y COMPORTAMENTALES EN ANIMALES NEONATALES.

### RESULTADOS

Para evaluar el efecto del tratamiento neonatal con naltrindol sobre las latencias basales en el *test* de la inmersión de la cola, se analizaron los datos de todos los animales incluidos en el estudio mediante el *test* de Student. El análisis no reveló efectos significativos del tratamiento neonatal (animales tratados neonatalmente con suero salino:  $1,73 \pm 0,12$ . n=20, animales tratados neonatalmente con naltrindol:  $1,87 \pm 0,09$ . n=19) sobre dichas latencias.

El Anova de dos vías (factores: tratamiento neonatal, tratamiento agudo) aplicado a los cocientes de latencias obtenidos en la prueba de inmersión de la cola, reveló un efecto significativo del tratamiento neonatal ( $p=0,01$ ). No se encontraron efectos significativos del tratamiento agudo, ni se vio interacción significativa entre tratamientos. El análisis *post-hoc* mostró que los animales tratados neonatalmente con naltrindol, tratados de forma aguda con suero o naltrindol, presentaron cocientes de latencias inferiores a los que presentaban los tratados neonatalmente con suero salino ( $p<0,05$ ) (Figura 11).

El Anova aplicado a los datos obtenidos en el tablero sin agujeros reveló efectos significativos del tratamiento agudo sobre la deambulación externa y total ( $p_s<0,001$ ), postura erguida ( $p=0,01$ ) y *grooming* ( $p<0,05$ ). Asimismo se observó un efecto significativo del tratamiento neonatal sobre la deambulación total ( $p<0,05$ ). No se encontró interacción

significativa entre el tratamiento neonatal y el tratamiento agudo en ninguno de los parámetros analizados en esta prueba. El análisis *post-hoc* mostró que la administración aguda de naltrindol produjo una disminución en la deambulaci3n externa, deambulaci3n total y postura erguida ( $p < 0,05$ ), y un aumento significativo del *grooming* ( $p < 0,05$ ) tanto en los animales tratados con suero salino como en los tratados con naltrindol durante el per3odo neonatal (Tabla 2). El tratamiento neonatal con naltrindol produjo un aumento significativo en la deambulaci3n total de los animales ( $p < 0,05$ ) y un aumento residualmente significativo en la deambulaci3n externa ( $p < 0,1$ ). Estos efectos se observan de manera m3s clara en los animales que recibieron SS de forma aguda, aunque la interacci3n entre factores no llega a ser significativa ni en la deambulaci3n total ( $p = 0,17$ ), ni en la externa ( $p = 0,13$ ) (Tabla 2, Figura 12). El efecto de la administraci3n aguda de naltrindol sobre el *grooming* tambi3n se observa m3s claramente en los animales tratados neonatalmente con suero salino, a pesar de que la interacci3n no result3 significativa.

Se puede observar que la *n* que se presenta en el estudio nociceptivo oscila entre 9-10 individuos, cuando la que se presenta en el tablero sin agujeros es de 10 individuos por grupo experimental. Esta diferencia se debe a que no se presentan los resultados obtenidos en la prueba nociceptiva para uno de los animales, ya que ocurri3 un error de registro en su latencia. As3, se analizaron los resultados obtenidos del comportamiento de dicho animal en el tablero sin agujeros, pero se excluyeron los obtenidos en la prueba nociceptiva.

**TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)  
RESPUESTA A NALTRINDOL  
TEST DE INMERSIÓN DE LA COLA  
MACHOS DE 20 DÍAS**

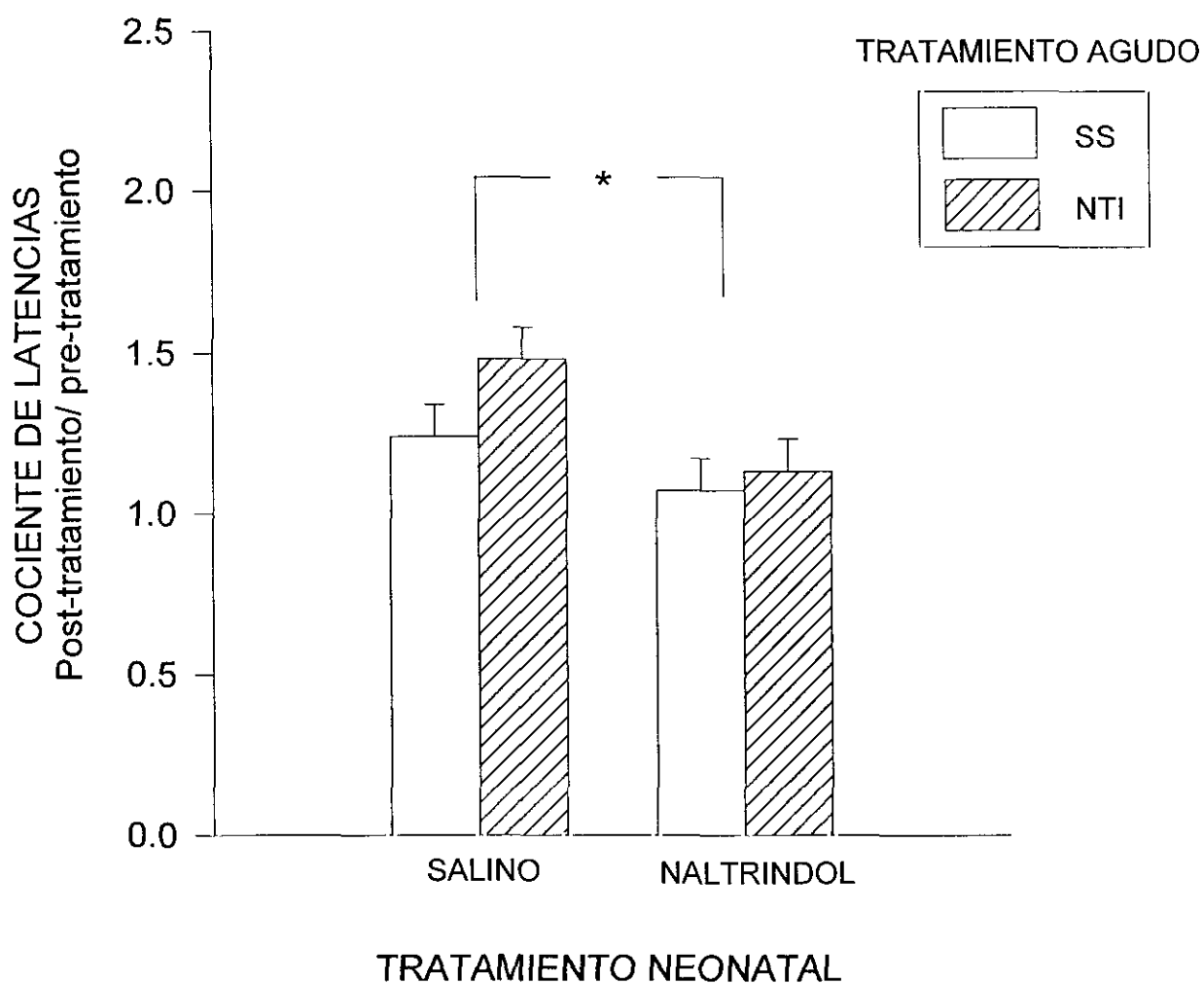


Figura 11. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 9-10 animales.

\* $p < 0,05$  diferencias entre los grupos de distinto tratamiento neonatal.

SS: suero salino, NTI: naltrindol.

**CAMPO ABIERTO (TABLERO SIN AGUJEROS)  
MACHOS DE 20 DÍAS DE EDAD  
TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)  
RESPUESTA A NALTRINDOL.**

TRATAMIENTOS		PARÁMETROS					
AGUDO	NEONATAL	DE	DI	DT	PE	G	DEF
	SS	167,3±7,0	61,9±5,1	229,2±9,5	43,0±3,1	1,3±0,2	0,4±0,2
SS							
	NTI	203,4±12,9	71,9±6,7	275,3±9,2	47,1±5,1	1,5±0,3	0,4±0,3
	SS	143,3±12,1	56,1±6,5	199,4±15,7	34,4±2,5	2,7±0,6	0,0±0,0
NTI		*		*	*	*	
	NTI	146,2±9,5	62,9±9,1	209,1±15,7	35,0±4,3	1,8±0,3	0,3±0,2

Tabla 2. Los valores corresponden a la media ± e.e.m. de 10 animales. SS: suero salino; NTI: naltrindol. DE: deambulaci3n externa; DI: deambulaci3n interna, DT: deambulaci3n total, PE: postura erguida, G: *grooming*, DEF: defecaci3n. Efecto significativo del tratamiento neonatal sobre la deambulaci3n total (p<0,05).  
\* p<0,05 frente a los grupos tratados de forma aguda con SS

**CAMPO ABIERTO (TABLERO SIN AGUJEROS)  
MACHOS DE 20 DÍAS DE EDAD  
TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)  
RESPUESTA A NALTRINDOL**

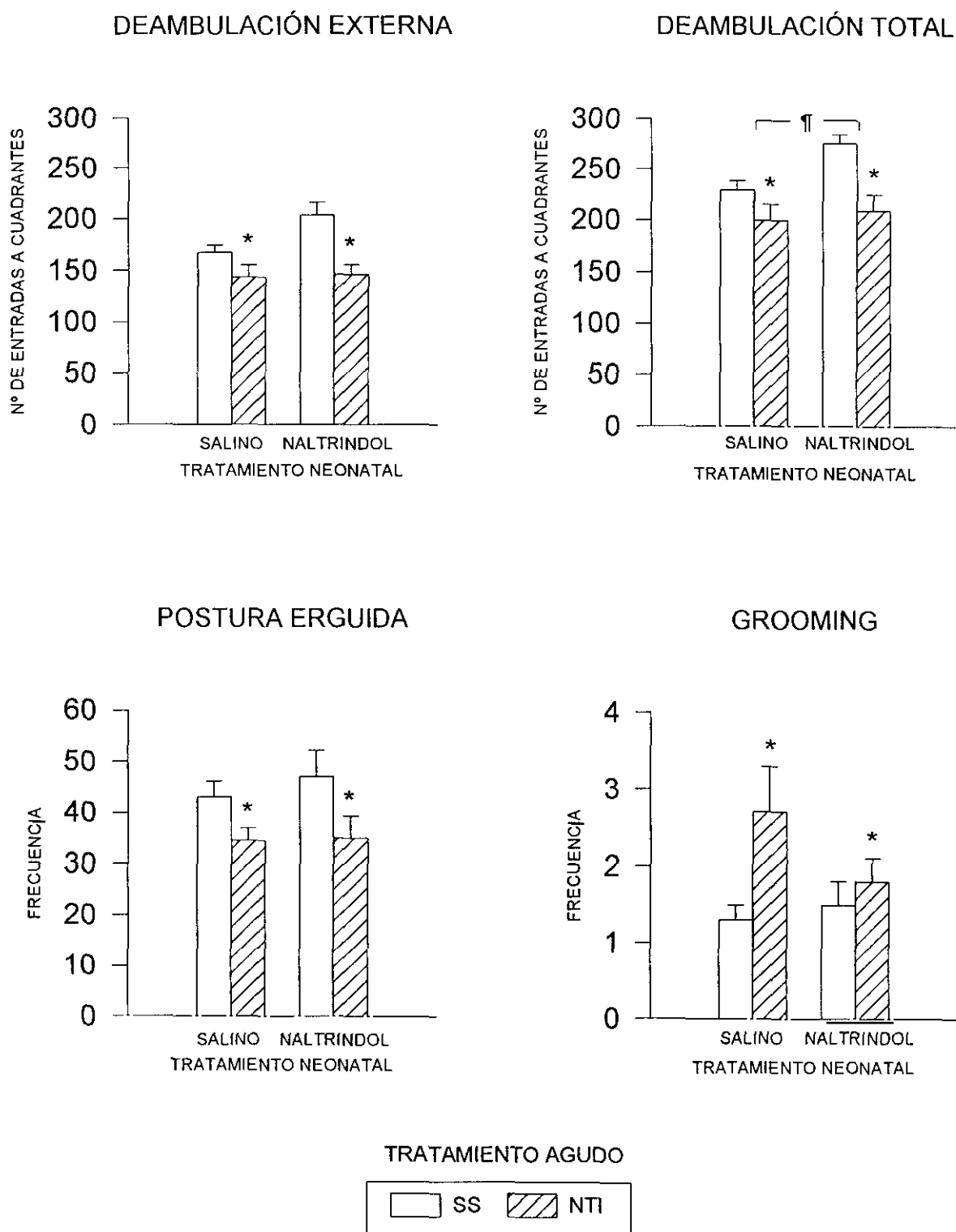


Figura 12. Los histogramas muestran la media  $\pm$  e.e.m. de 10 animales.

\*  $p < 0,05$  frente al grupo tratado de forma aguda con suero salino.

‡  $p < 0,05$  diferencias entre los grupos de tratamiento neonatal.

SS: suero salino, NTI: naltrindol.

## DISCUSIÓN

La inmensa mayoría de los trabajos sobre efectos de ligandos del receptor  $\delta$  (sobre todo los referidos a antagonistas) sobre nocicepción y comportamiento se refieren a animales adultos, por lo que es a ellos a los que nos referiremos generalmente en la discusión de este apartado. Por la razón expuesta, los resultados obtenidos en nuestro estudio con animales de 20 días resultan particularmente novedosos.

Los resultados obtenidos en la prueba nociceptiva de la inmersión de la cola de estos animales, indican que el tratamiento crónico neonatal con naltrindol no modificó las latencias basales obtenidas en esta prueba. Estos datos concuerdan con los obtenidos en otros experimentos realizados en esta Tesis Doctoral (apartados V.1.1., V.1.2.), así como con trabajos previos de nuestro grupo (Antelo y col. 1998, Alberti y col. 1999) y refuerzan la interpretación de que el receptor  $\delta$  no parece ejercer un control tónico en el establecimiento de la sensibilidad al dolor (ver discusión de apartado V.1.1).

La inyección aguda de una dosis de 1mg/kg de naltrindol no modificó significativamente los cocientes de latencias obtenidos a los 15 minutos de su administración, en animales de 20 días de edad. De acuerdo con nuestros resultados, otros autores tampoco encuentran efectos intrínsecos del naltrindol (2,5 y 3 mg/kg) sobre los umbrales nociceptivos valorados en el *test* de la inmersión de la cola y el *test* de la placa caliente en ratón (Matthes y col. 1998, Narita y col. 1993). Estudios realizados por otros autores indican que únicamente la dosis de 10 mg/kg de naltrindol fue capaz de producir, a los 30 y 45 minutos de su administración, aumentos significativos en las latencias nociceptivas de ratas de 45-50 días de edad, obtenidas en el *test* de la inmersión de la cola, efecto que sugieren podría ser debido a una cierta actividad del naltrindol como agonista parcial o bien a la producción de algún metabolito activo. En el caso del naltrindol tuviera alguna acción como agonista parcial, debe ser a dosis altas, ya que en este mismo estudio,

las dosis de 0,3 y 1mg/kg no modificaron las latencias nociceptivas a ninguno de los tiempos estudiados (15, 30, 45 y 60 minutos) (Jackson y col. 1989). En estudios realizados por otros autores se ha visto que la administración intracerebroventricular de los antagonistas selectivos  $\delta$  ICI 154129 o ICI 174864 produjo antinocicepción en el *test* de la contracción abdominal inducida por la inyección de ácido acético en ratón (Leander y col. 1988). Otros autores encontraron, a dosis muy altas, actividad antinociceptiva del naltrindol en el *test* del ácido acético en ratón, y explican que podría estar mediada a través de receptores  $\kappa$  dado que, en su estudio, el antagonista  $\kappa$  nor-binaltorfimina inhibió significativamente el efecto antinociceptivo del naltrindol (Takemori y Portoghese 1992).

Independientemente del tratamiento agudo recibido, los animales tratados neonatalmente con naltrindol mostraron cocientes de latencia significativamente inferiores a los controles tratados neonatalmente con salino. El cociente de latencias ligeramente aumentado en estos últimos grupos (cocientes entre 1 y 1,5) podría ser debido al estrés ocasionado por el propio protocolo de prueba. Dicho protocolo presumiblemente podría haber producido una cierta antinocicepción inducida por estrés que se detectó con los tiempos de registro de este experimento. El hecho de que este efecto no se observe en los animales tratados neonatalmente con naltrindol (cocientes de aproximadamente 1) indica que el bloqueo funcional del receptor  $\delta$  mediante el tratamiento crónico con naltrindol evitó la modesta antinocicepción inducida por estrés. No resulta improbable que esta antinocicepción implique al receptor  $\mu$ , en cuyo caso, los presentes resultados podrían constituir una indicación indirecta de interacción  $\mu$ - $\delta$  que, como ya hemos visto, quedó demostrada de forma clara en el estudio realizado con el agonista alfentanil en machos de 20 días de edad, que ya ha sido discutido en un apartado anterior.

Los resultados obtenidos en la prueba de comportamiento, realizada 5 minutos después de la prueba nociceptiva, indican que la administración aguda de naltrindol provocó un descenso significativo de la deambulación externa, total y postura erguida en el tablero

sin agujeros. Estos resultados confirman estudios previos de nuestro grupo de investigación en los que obtuvimos datos indirectos acerca de un posible efecto inductor de hipoactividad del naltrindol a esta edad (Viveros y col. 1997). A la vista de los efectos que produce el naltrindol sobre la deambulación parece claro que este antagonista  $\delta$ , administrado de forma aguda, produce hipoactividad en animales neonatales. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde se ha encontrado que el naltrindol indujo depresión en la actividad motora de animales adultos (Jones y col. 1993). Se han realizado estudios en los que se ha encontrado, que la administración intraventricular del agonista  $\delta$  DPDPE a ratones adultos, produce una hiperactividad locomotora horizontal (Mickley y col. 1990) y que la administración de agonistas  $\delta$  en ratón adulto afecta a la locomoción, incrementando la exploración, la postura erguida y el olfateo (Longoni y col. 1991, Morelli y col. 1989). Otros autores han encontrado que la administración de agonistas selectivos  $\delta$  -DTLET, DSTBULET, BUBU- o de inhibidores del catabolismo de las encefalinas -kelatorfan- a ratas macho adultas, induce hiperactividad en ambientes familiares (actímetro), no familiares (tablero de agujeros) e inductores de miedo (campo abierto), efectos que se ven suprimidos por naloxona y antagonistas selectivos  $\delta$  como el ICI 174,864 o el naltrindol (Calenco-Choukroun y col. 1991). Por otro lado, otros autores han encontrado que la administración central de diversos antagonistas opioides reduce la actividad. Así se ha visto que el antagonista opioide  $\beta$ -clornaltrexamina, reduce la actividad locomotora en ratón adulto (Kozak y col. 1995) y que la hiperactividad motora inducida por anfetamina en roedores es reducida por antagonistas generales (Hitzemann y col. 1982, Hooks y col. 1992, Swerdlow y col. 1987) y antagonistas  $\delta$  (naltrindol),  $\delta_1$  (DALCE) y  $\delta_2$  (NTII) (Jones y col. 1993). En general se ha observado que la administración periférica de los antagonistas naloxona y naltrexona produce disminuciones dosis dependientes de la actividad exploratoria y ambulatoria, en pruebas que implican novedad, tanto en rata (Arnsten y Segal 1979, File

1980, Katz 1979, 1988, Rodgers y Deacon 1979, Schmajuk 1984), como en ratón (Castellano y Puglisi-Allegra 1982, Grevert y Goldstein 1977, Katz y Gelbart 1978).

En nuestro estudio, la administración aguda de naltrindol produjo además de un descenso en la actividad motora horizontal, un descenso significativo en la tasa de postura erguida. Algunos autores han encontrado que la administración de agonistas selectivos  $\delta$  como el DPDPE produce incrementos en la tasa de postura erguida en rata adulta que son reducidos selectivamente por la inyección del antagonista selectivo  $\delta$  ICI 174864 (Cowan y col. 1986). Otros autores encontraron un fuerte incremento en la locomoción y postura erguida en la prueba de campo abierto tras la administración del inhibidor del metabolismo de las encefalinas kelatorfan en el área tegmental ventral, lo que sugiere una actividad fásica del sistema endógeno encefalinérgico en dicha área. Estos efectos fueron bloqueados por la administración previa de naltrindol, sugiriendo que la activación de las vías dopaminérgicas mesolímbicas podrían estar controladas por las encefalinas endógenas, a través de la activación selectiva, o al menos preferencial de los receptores opioides  $\delta$ , en el área tegmental ventral, como ya observaron en el núcleo accumbens Maldonado y sus colaboradores (Maldonado y col. 1990) (Calenco-Choukroun y col. 1991). La postura erguida puede considerarse en esta prueba un índice de la actividad exploratoria del animal. Según nuestra interpretación nuestros resultados indican que la administración aguda del antagonista  $\delta$  naltrindol reduce la actividad exploratoria de los animales neonatales en esta prueba. Así pues, teniendo en cuenta los resultados de otros autores y los obtenidos por nosotros en este estudio, los agonistas  $\delta$  parecen inducir aumentos de la deambulación y de la postura erguida en animales adultos, mientras que los antagonistas  $\delta$  parecen inducir hipoactividad tanto en animales adultos como neonatales.

La administración aguda de naltrindol no produjo efectos significativos sobre la deambulación interna, ni sobre la tasa de defecación, pero indujo un aumento significativo en la tasa de *grooming*. El *grooming* puede considerarse una pauta liberadora de estrés; de

acuerdo con esta interpretación la administración de naltrindol produciría en el animal un cierto grado de estrés, lo que estaría de acuerdo con el supuesto efecto ansiolítico asignado a las encefalinas endógenas (Köning y col. 1996). En todo caso, la ausencia de efecto sobre la deambulación interna (otro parámetro indicativo del nivel de emotividad) indica que el antagonismo agudo del receptor  $\delta$  no induce un aumento global en la emotividad del animal. El aumento del *grooming* sugiere un efecto específico sobre ciertos componentes de la respuesta al estrés.

En cuanto a los pocos estudios encontrados de los efectos de agonistas o antagonistas  $\delta$  opioides en animales neonatales, la administración del agonista selectivo  $\delta$  DPDPE (0,1-10 mg/kg) a ratas neonatales de 5, 10 y 20 días de edad no modificó significativamente la actividad general de los animales (locomoción, postura erguida, *grooming* etc...). Los autores explican que la falta de efecto del agonista  $\delta$  podría ser consecuencia del desarrollo tardío del receptor  $\delta$  (Jackson y Kitchen 1989a). Este resultado concuerda con el encontrado previamente por nuestro grupo de investigación en el que la administración aguda de DPDPE (4 mg/kg) a ratas macho de 20 días no produjo modificación significativa en los parámetros registrados en el tablero sin agujeros (Viveros y col. 1997). Las diferencias encontradas en los efectos comportamentales de agonistas exógenos  $\delta$  opioides en neonatos y adultos, sugieren que el papel fisiológico de este receptor puede ser diferente en las distintas etapas del desarrollo. En todo caso, los efectos marcados sobre la actividad motora observados en el presente trabajo tras la administración del antagonista  $\delta$  naltrindol, indican la implicación del receptor  $\delta$  en la modulación de la actividad motora.

Existen discrepancias acerca del papel tónico que juegan los péptidos opioides en la locomoción. Como indicamos más arriba, numerosos estudios indican que los antagonistas opioides inducen hipoactividad. Sin embargo, otros datos parecen contradictorios con esta idea, así algunos autores no encuentran cambios en la locomoción con la administración de

los antagonistas naltrexona (Balcells-Olivero y Vezina 1996, Kelley y col. 1996, Zhang y col. 1996) naloxona (Philopena y col. 1996), naloxonacina (Kelley y col. 1996) y  $\beta$ -funaltrexamina (Kelley y col. 1996), mientras que otros datos indican que la naloxona y el naltrindol inyectados en el núcleo accumbens atenúan la locomoción y que la inyección de naloxona en el núcleo septal medial la estimula (Kelley y col. 1996). Estos últimos datos parecen indicar diferentes acciones según el área encefálica en el que se administren los antagonistas. De nuestro estudio se deduce que la administración aguda periférica del antagonista opioide  $\delta$  naltrindol produce hipoactividad motora, lo que nos sugiere que el receptor opioide  $\delta$  está implicado de alguna manera en los mecanismos que regulan de forma tónica la actividad motora de los animales neonatales, así parece que los opioides endógenos actuarían sobre estos receptores, quizá interaccionando con otros sistemas neuroquímicos relacionados, modulando a la alza la actividad motora. Trabajos previos en animales adultos también han sugerido la existencia de una actividad tónica del sistema opioide que podría modular la actividad motora (Negri y col. 1996, 1999). En estudios realizados con ratones *Knockout* para el gen que codifica la preproencefalina, se ha observado una alteración del comportamiento espontáneo. Estos ratones presentaron una actividad locomotora disminuida, lo que sugiere una actividad tónica de estos ligandos endógenos en la modulación de la locomoción (Köning y col. 1996). Puesto que las encefalinas presentan una relativamente mayor selectividad por los receptores  $\delta$ , cabe pensar que este receptor esté implicado en una modulación tónica a la alza de la actividad motora.

En cuanto a los efectos producidos por la administración crónica de naltrindol durante el periodo neonatal, dicho tratamiento produjo hiperactividad en los animales manifestada en una deambulación externa y total incrementadas, efecto contrario al producido por la administración aguda del mismo compuesto. Esto podría ser indicativo de cambios adaptativos de tipo compensatorio en el receptor  $\delta$  y/o en otros mecanismos

neuroquímicos con los que dicho receptor pudiera interaccionar y que estén involucrados en la modulación tónica de la actividad motora. Como ya se ha indicado la plasticidad o capacidad de ajuste del sistema opioide a tratamientos farmacológicos parece ser mayor en las primeras semanas postnatales en las que los receptores opioides se encuentran en rápido desarrollo y serían más susceptibles a los distintos tratamientos. Nuestro tratamiento con naltrindol tuvo lugar en estas etapas, por lo que este tipo de fenómenos podrían producirse, con más facilidad que en etapas adultas. Como ya hemos mencionado, en diversos estudios se ha puesto de manifiesto que tras la finalización de un tratamiento de bloqueo opioide funcional, se produce una supersensibilidad del sistema debida a una elevación marcada del número de receptores (Bardo y col. 1982, 1983a, Baron y col 1985, Sharma y col. 1988). Se ha visto que el tratamiento con naloxona durante los 21 primeros días de vida indujo aumentos en los sitios de unión de [<sup>3</sup>H]naloxona en médula espinal, hipotálamo, estriado y cortex un día después de la última inyección de naloxona. Sin embargo 3 días después sólo se encontraron aumentos en el mesencéfalo y estriado y 7 y 14 días después no se detectaron cambios significativos en los sitios de unión de [<sup>3</sup>H]naloxona (Bardo y col. 1983a). De forma similar, ratas tratadas durante el período prenatal con naloxona no manifestaron alteración en los sitios de unión 5 días después del cese del tratamiento (Coyle y Pert 1976). La supersensibilidad producida tras un bloqueo crónico de receptores se obtiene más rápidamente en infantes que en adultos, pero tras la interrupción del bloqueo, en los infantes se disipa antes.

Nuestro tratamiento neonatal tuvo lugar durante los 19 primeros días de vida postnatal, por tanto, en los animales de 20 días las pruebas tuvieron lugar un día después de la finalización del tratamiento. Sin embargo, en nuestro caso la hipótesis de un aumento significativo en la densidad de receptores no parece la más plausible dado que en estudios preliminares hemos observado que el mismo tratamiento con naltrindol empleado en esta Tesis no parece producir modificaciones importantes en la densidad de receptores  $\mu$  y  $\delta$

encefálicos en ratas neonatales (Goody y col. 1998). Por tanto, más bien parece que el tratamiento crónico produciría cambios en la sensibilidad de los receptores, o bien provocaría cambios compensatorios en sistemas neuroquímicos relacionados con los que podría interaccionar o cooperar en la modulación tónica de la actividad motora.

En un trabajo reciente se ha observado que la administración de anticuerpos frente a met-enkefalinas en ratas neonatales produjo disminuciones en los niveles de met-enkefalina y sustancia P en estriado, reducción de neurotensina en el núcleo accumbens, un aumento en la actividad locomotora espontánea y una reducción significativa de la actividad inducida por agonista dopaminérgico en edad adulta. El aumento en la actividad espontánea se correlacionó con niveles y liberación de DA aumentados en estriado, sin embargo los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> no se vieron alterados (autorradiografía) en ratas tratadas con anticuerpos frente a met-enkefalina, por lo que los resultados se atribuyeron a una subsensibilización en receptores dopaminérgicos postsinápticos implicados en la regulación del comportamiento (Ceballos y Fontenla 1999). Puesto que las enkefalinas presentan una mayor selectividad relativa por el receptor  $\delta$ , estos datos podrían sugerir interacciones entre el receptor  $\delta$  y el sistema dopaminérgico en la modulación de la actividad motora. Como veremos en otro apartado de esta Tesis (apartado V.4.4.), nuestro tratamiento crónico con naltrindol también produjo una alteración en el cociente DOPAC/DA en sustancia nigra de machos de 20 días de edad, lo cual podría correlacionarse con la hiperactividad mostrada por estos animales. El hecho de que esta hiperactividad se viera atenuada por una administración aguda del antagonista  $\delta$  poco antes de la realización de la prueba comportamental es atribuible al bloqueo agudo del receptor.

#### V.4.2. EFECTOS A CORTO PLAZO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL EN ANIMALES ADULTOS.

-Efectos del tratamiento crónico con naltrindol sobre el comportamiento y niveles de corticosterona.

### **RESULTADOS**

#### *Tablero con agujeros.*

El análisis de los datos obtenidos de los animales tratados crónicamente con SS o NTI se llevó a cabo mediante el *test* de Student. Este análisis reveló efectos residualmente significativos del tratamiento crónico sobre algunos de los parámetros registrados en esta prueba. Así los animales tratados crónicamente con naltrindol presentaron un aumento en la deambulación externa y total ( $p_s < 0,1$ ) (Figura 13) y un descenso en la frecuencia de postura erguida ( $p < 0,1$ ) frente a los tratados crónicamente con solución salina. Ni la frecuencia ni el tiempo de exploración de agujeros fueron significativamente afectados por el tratamiento crónico con naltrindol (Tabla 3, Figura 14).

#### *Laberinto en cruz.*

El *test* de Student aplicado a los datos obtenidos en esta prueba, que recordemos se realizó inmediatamente después de la finalización del tablero con agujeros, no reveló efectos significativos del tratamiento crónico con naltrindol sobre los parámetros registrados. Así, los animales de ambos tratamientos crónicos (suero salino o naltrindol) presentaron valores similares de los porcentajes de entrada y tiempo transcurrido en cada tipo de brazo. Tampoco se observaron diferencias significativas en los valores de entradas y tiempo total en brazos, entre animales de distinto tratamiento crónico (Tabla 4, Figura 15).

*Valoración de corticosterona.*

Los valores de concentración de corticosterona en suero obtenidos a los 5 minutos de la finalización de la prueba del laberinto en cruz, en animales con tratamiento crónico SS o NTI, fueron analizados mediante el *test* de Student. Este análisis no encontró efectos significativos del tratamiento crónico con naltrindol, sobre los niveles de corticosterona. Así, ambos grupos de tratamiento crónico presentaron valores semejantes de concentración de hormona en suero (animales tratados crónicamente con suero salino:  $324,9 \pm 32,2$  ng/ml; animales tratados crónicamente con naltrindol:  $361,1 \pm 19,3$  ng/ml).

**TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL(8 DÍAS)  
TABLERO CON AGUJEROS (DÍA 9)  
MACHOS ADULTOS**

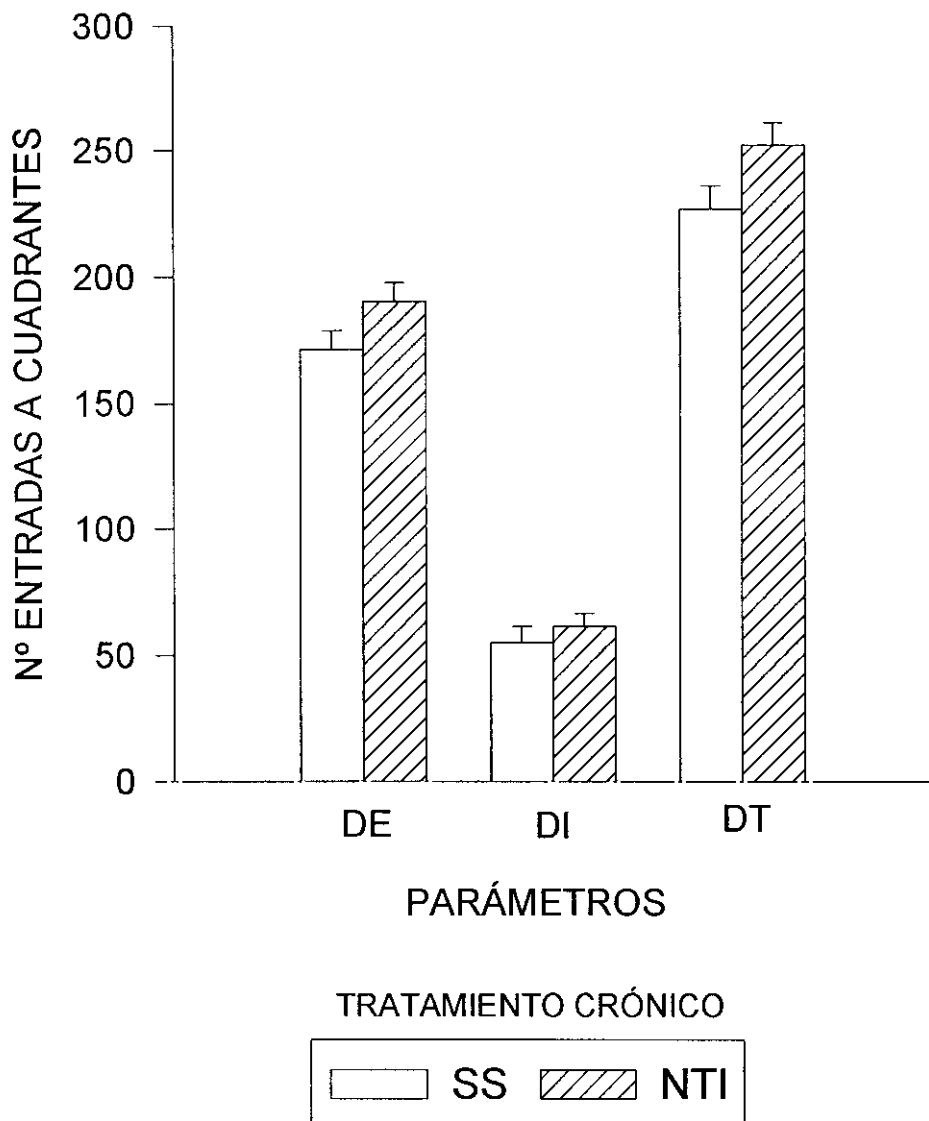


Figura 13. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 14-15 animales. DE: deambulación externa; DI: deambulación interna, DT: deambulación total. Diferencias residualmente significativas ( $p < 0,1$ ) en DE y DT entre los grupos de tratamiento crónico.

**TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL (8 DÍAS)  
TABLERO CON AGUJEROS (DÍA 9)  
MACHOS ADULTOS**

TRATAMIENTO CRÓNICO	PARÁMETROS							
	DE	DI	DT	PE	G	DEF	F.EXP.	TPO.EXP.
SS	171,2±7,3	55,2±6,2	226,4±9,2	32,7±2,6	1,5±0,4	3,6±0,9	9,8±1,5	20,6±3,8
NTI	190,3±7,4	61,4±5,1	251,7±9,1	27,1±1,7	1,3±0,4	2,1±0,6	10,9±1,5	23,7±4,2

Tabla 3. Los valores corresponden a la media  $\pm$  e.e.m de 14-15 animales. SS: suero salino, NTI: naltrindol.  
DE: deambulaci3n externa, DI: deambulaci3n interna, DT: deambulaci3n total, PE: postura erguida,  
G: *grooming*, DEF: defecaci3n, F.EXP.: frecuencia exploratoria, TPO.EXP.: tiempo de exploraci3n.  
Diferencias residualmente significativas ( $p < 0,1$ ) en DE, DT y PE entre los grupos controles y los tratados con NTI.

**TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL (8 DÍAS)  
TABLERO CON AGUJEROS (DÍA 9)  
MACHOS ADULTOS**

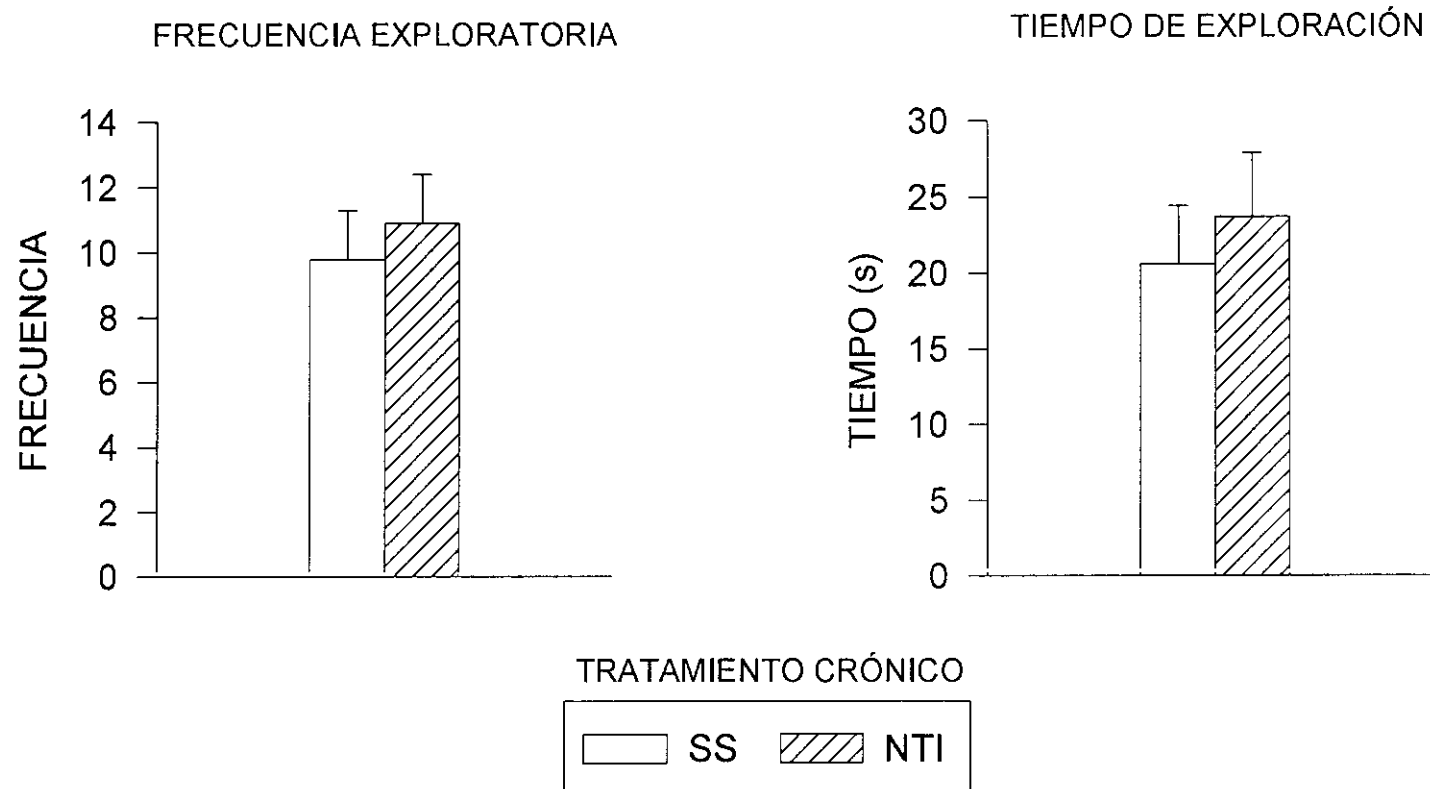


Figura 14. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 14-15 animales.  
SS: suero salino, NTI: naltrindol.

**TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL (8 DÍAS)  
LABERINTO EN CRUZ (DÍA 9)  
MACHOS ADULTOS**

TRATAMIENTO	PARÁMETROS					
CRÓNICO	% Entradas a brazos abiertos	% Entradas a brazos cerrados	% Tiempo en brazos abiertos	% Tiempo en brazos cerrados	Entradas totales en ambos brazos	Tiempo total en ambos brazos
SS	14,9±4,1	85,1±4,1	12,5±4,6	87,5±4,6	11,5±1,3	171,8±13,0
NTI	15,4±3,6	84,6±3,6	16,4±4,5	83,6±4,5	11,2±1,0	178,9±14,8

Tabla 4. Los valores corresponden a la media  $\pm$  e.e.m. de 12-13 animales.  
SS: suero salino, NTI: naltrindol.

**TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL (8 DÍAS)  
LABERINTO EN CRUZ (DÍA 9)  
MACHOS ADULTOS**

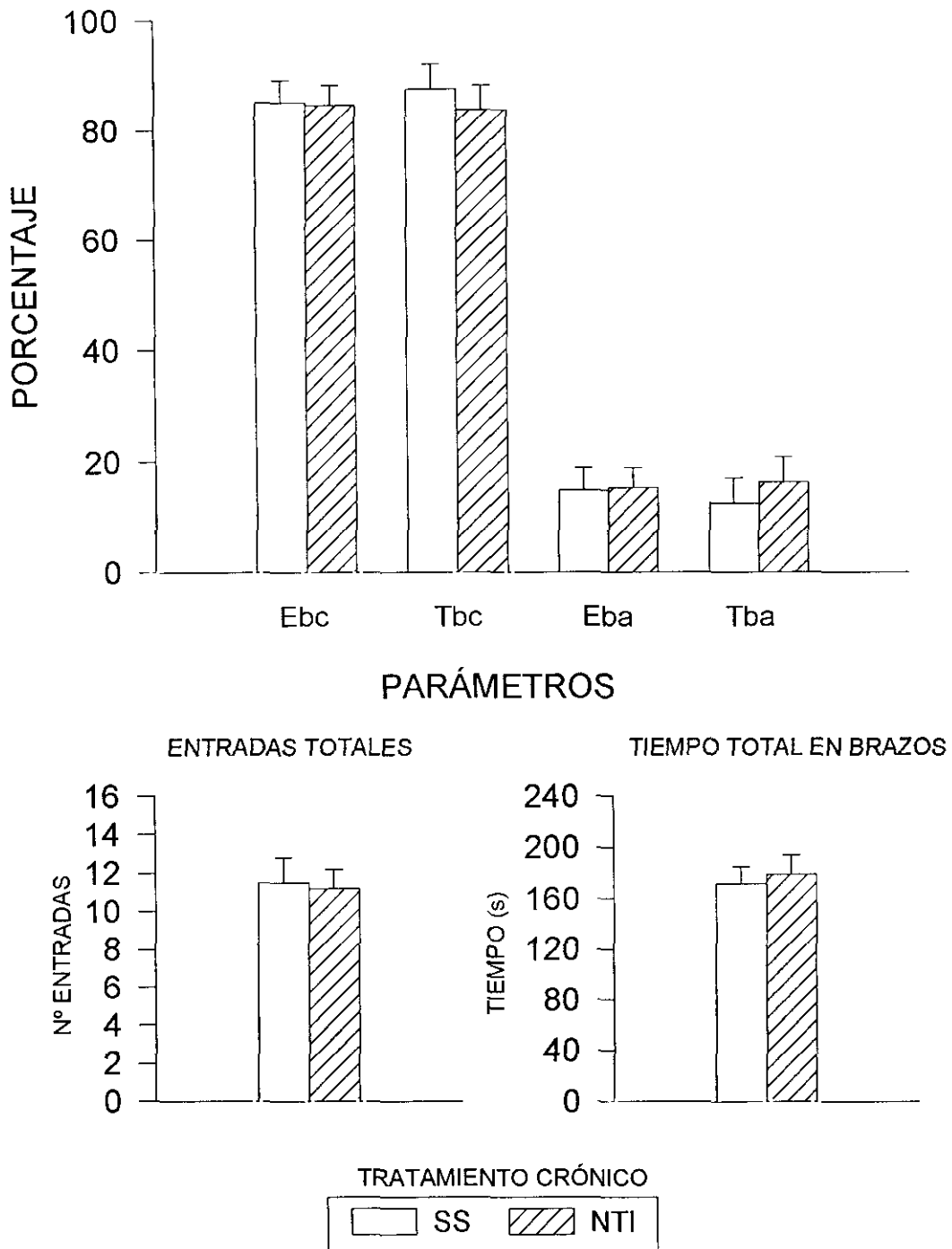


Figura 15. Los histogramas muestran la media  $\pm$  e.e.m. de 12-13 animales.  
 Ebc: entradas a brazos cerrados; Tbc: tiempo en brazos cerrados.  
 Eba: entradas a brazos abiertos; Tba: tiempo en brazos abiertos.  
 SS: suero salino, NTI: naltrindol.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el tablero con agujeros muestran que los animales tratados durante 8 días consecutivos con naltrindol, presentaron al día siguiente aumentos residualmente significativos en la deambulación externa y total en esta prueba, con respecto a los tratados crónicamente con suero salino. Dado que, en esta prueba, estos parámetros son indicativos de la actividad locomotora general del animal, podemos decir que el tratamiento crónico con naltrindol produjo un modesto aumento de actividad motora horizontal en nuestros animales. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos en el estudio previamente discutido realizado en machos de 20 días de edad, en los que el bloqueo crónico neonatal del receptor  $\delta$  opioide también produjo hiperactividad motora pero de una forma más marcada (apartado V.4.1).

Como ya hemos apuntado en el apartado anterior, diversos estudios indican que la administración de agonistas selectivos  $\delta$  conduce a hiperactividad motora en roedores (Calenco-Choukroun y col. 1991, Longoni y col. 1991, Mickley y col. 1990, Morelli y col. 1989). Se ha observado que la administración central del agonista selectivo  $\delta$  DPDPE produce activación comportamental, aunque altas dosis del péptido inducen depresión comportamental y rotación en barril (Cowan y col. 1985). De diversos datos parece deducirse que la estimulación del receptor opioide  $\delta$  induce activación comportamental en animales adultos mientras que la administración de antagonistas opioides induce hipoactividad en roedores (Arnsten y Segal 1979, Castellano y Puglisi-Allegra 1982, File 1980, Grevert y Goldstein 1977, Katz 1979, 1988, Katz y Gelbart 1978, Rodgers y Deacon 1979, Schmajuk 1984).

Por otro parte, muchos estudios han demostrado que el tratamiento crónico con antagonistas opioides puede incrementar la potencia (supersensibilidad) de los agonistas opioides tanto en sistemas *in vitro* (Schulz y col. 1979), como *in vivo* (Bardo y col. 1983ab,

Millan y col. 1988, Tang y Collins 1978, Tempel y col. 1985, Yoburn y col. 1985, 1986, 1988, 1989a). Paralelamente a estos cambios farmacodinámicos, estudios de *binding* han mostrado incrementos en la densidad (*up-regulation*) de los receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  en el sistema nervioso central (Bardo y col. 1982, 1983ab, Baron y col. 1985, Lahti y Collins 1978, Morris y col. 1988, Sharma y col. 1988, Tempel y col. 1985, Yoburn y col. 1985, 1986, 1989b, Zukin y col. 1982) y en zonas periféricas (Schulz y col. 1979) sin detectarse modificaciones en la afinidad de los receptores.

En estudios realizados en ratón se ha observado que un tratamiento crónico (8 inyecciones a intervalos de 12 horas) con el antagonista  $\delta$  ICI 154129 produjo un incremento en el número de sitios de unión del agonista selectivo  $\delta$  [ $^3\text{H}$ ] DADLE en estriado y tallo cerebral mientras que no afectó a los sitios de unión del agonista selectivo  $\mu$  [ $^3\text{H}$ ] DHM, ni modificó el efecto estimulante de la morfina sobre la locomoción (Volterra y col. 1984). Existen experimentos en los que un tratamiento en ratas macho adultas con el antagonista naltrexona, durante el mismo tiempo que el utilizado en nuestro estudio, produce incrementos significativos en los sitios de unión opioide (Rothman y col. 1989). Se ha encontrado también, que un día de tratamiento no es suficiente para producir incrementos en los receptores opioides cerebrales, mientras que tratamientos más largos, de 8 días en adelante, sí son capaces de producir estos incrementos (Bardo y col. 1983b, Yoburn y col. 1990). Teniendo en cuenta estos datos, elegimos una duración de 8 días para nuestros tratamientos crónicos en adultos. No podemos excluir la posibilidad de que el bloqueo crónico del receptor  $\delta$  haya podido inducir algún modesto incremento en el número y/o sensibilidad de dichos receptores, lo que podría explicar, al menos en parte, el ligero aumento de actividad motora encontrada en el grupo de animales tratados crónicamente con naltrindol. También cabría pensar en algún cambio compensatorio en sistemas neuroquímicos relacionados con el sistema opioide implicados en la modulación tónica de la actividad, tal como discutimos previamente en el estudio realizado en neonatos. En todo

caso, el hecho de que el tratamiento crónico con naltrindol haya tenido efectos mucho más marcados en la actividad motora en animales de 20 días que en adultos podría deberse a varias razones. Por un lado ya hemos apuntado que la plasticidad de los receptores opioides parece ser mayor en el período neonatal, momento en el que dichos receptores se encuentran en rápido desarrollo, y además el tratamiento crónico con el antagonista tuvo una duración más larga en el caso de los animales neonatales. Por otra parte las ratas de 20 días podrían ser especialmente sensibles al tratamiento con el antagonista como consecuencia de una excreción más lenta del naltrindol. Este tipo de interpretación ya ha sido previamente expuesta por otros autores que encontraron efectos de un tratamiento crónico con naloxona en animales neonatales, pero no en adultos (Bardo y col. 1983b).

El tratamiento crónico con naltrindol produjo un descenso residualmente significativo en la postura erguida. Es relativamente discutible el valor atribuible a la tasa de postura erguida en esta prueba. Aunque se ha considerado a este parámetro como exploratorio en otras observaciones comportamentales (Gray 1991, Kovács y De Wied 1978, Meyerson y col. 1988), en el tablero de agujeros cabría considerar la tasa de postura erguida más como un parámetro de actividad general o, en todo caso, de exploración inespecífica, por contraposición a la exploración dirigida representada en el hecho de explorar los agujeros/estímulo; en este sentido apuntan los distintos trabajos que emplean esta prueba (File y Wardil 1975, Steenbergen y col. 1991, Wilson y col. 1991). Desde este punto de vista, y a la vista de lo expuesto anteriormente respecto a los efectos sobre la actividad horizontal, hubiera sido esperable encontrar también aquí una tendencia al aumento de la postura erguida. Algunos autores han encontrado que la administración de agonistas selectivos  $\delta$  como el DPDPE produce incrementos en la tasa de postura erguida en rata adulta, que son reducidos selectivamente por la inyección del antagonista selectivo  $\delta$  ICI 174864 (Cowan y col. 1986) y que la administración del inhibidor del metabolismo de las encefalinas kelatorfan, produce un incremento en la locomoción y la postura erguida

(Calenco-Choukroun y col. 1991) efecto bloqueado por la administración de naltrindol; sin embargo en otros estudios se ha observado que la administración i.c.v. de DPDPE a ratones no modifica su actividad vertical (Mickley y col. 1990). Por otra parte hay que recordar que en los animales neonatales nuestro tratamiento crónico con naltrindol aumentó la actividad motora general pero no modificó la postura erguida. Así pues, la modulación tónica de la actividad de los animales por parte del receptor  $\delta$ , parece ser más compleja en el caso de la actividad vertical.

Los parámetros más relacionados con la actividad exploratoria del animal en esta prueba, como son la frecuencia y duración de exploración de agujeros no se vieron modificados por el tratamiento crónico con naltrindol. Estos resultados parecen estar de acuerdo con otros datos que indican que la administración a ratas del agonista selectivo  $\delta$  DTLET en el área tegmental ventral, no modificó significativamente el número ni la duración de las visitas a los agujeros en el tablero con agujeros (Calenco-Choukroun 1991). Por otra parte, también se observó en este trabajo que la administración del agonista selectivo  $\delta$  DSTBULET incrementó significativamente la duración de las visitas, efecto que fue antagonizado por el antagonista selectivo  $\delta$  ICI 174,864; sin embargo ninguno de los dos agonistas modificó significativamente la frecuencia de visitas que es la variable exploratoria más importante en esta prueba (Calenco-Choukroun 1991). Parece, por tanto, que el receptor  $\delta$  no está implicado de una manera importante en la modulación de la exploración dirigida a estímulos mientras que, como ya se ha discutido, sí parece estar involucrado en la modulación de la actividad motora general en el campo abierto y en el tablero con agujeros.

En cuanto a los resultados obtenidos en la prueba de laberinto en cruz, realizada inmediatamente después del tablero con agujeros, observamos que el tratamiento crónico con naltrindol no modificó ninguno de los parámetros valorados en este *test*. Evidencias comportamentales y fisiológicas han demostrado que la tendencia a evitar los brazos abiertos está motivada por el miedo y la ansiedad (Pellow y col. 1985, Pellow y File 1986).

En este sentido nuestros resultados indican que nuestro tratamiento crónico con el antagonista  $\delta$  no modificó los niveles de ansiedad de los animales, lo que parece indicar que el receptor  $\delta$  no está implicado sustancialmente en la modulación de las respuestas de ansiedad, al menos en el laberinto en cruz. Nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que observaron que la administración aguda de los agonistas  $\delta$  DTLET, DSTBULET o BUBU en el área tegmental ventral, no produjo modificaciones en el comportamiento de ratas en el laberinto en cruz. Asimismo, la administración aguda de kelatorfan -inhibidor del catabolismo de las encefalinas- tampoco produjo cambios comportamentales en el laberinto en cruz elevado. Estos datos indican que los agonistas  $\delta$  y las encefalinas endógenas no modificaron el estado emocional de los animales (Calenco-Choukroun 1991). Conviene también recordar, que nuestros tratamientos con naltrindol no modificaron la tasa de deambulación interna (parámetro indicativo de la emotividad de los animales), ni en adultos ni en neonatos, lo que avala la idea de que el receptor  $\delta$  no parece ejercer un control tónico sobre el estado general de emotividad o ansiedad de los animales. Tampoco se vieron modificados significativamente el número total de entradas a brazos ni la frecuencia de visitas a los brazos cerrados, parámetros que están relacionados básicamente con la actividad general de los animales (Graeff y col. 1990, Johnston y File 1991, Pellow y col. 1985, Wilson y col. 1991). Así, nuestro tratamiento con naltrindol no afectó a los parámetros directamente relacionados con la ansiedad ni afectó la actividad general de los animales en esta prueba. Dado que en la prueba de tablero de agujeros sí observamos una actividad horizontal ligeramente aumentada en los animales tratados con naltrindol, puede sugerirse que los efectos dependen del tipo de prueba, probablemente debido a las diferentes características y al diferente nivel de estrés que una y otra suponen.

En cuanto a los resultados obtenidos en la valoración de corticosterona, observamos que el tratamiento crónico con naltrindol durante 8 días consecutivos no afectó a los niveles séricos de dicha hormona obtenidos a los 5 minutos de la finalización del laberinto en cruz,

prueba realizada un día después de la finalización del tratamiento. Conviene recordar que en el estudio realizado acerca del efecto del tratamiento neonatal con naltrindol sobre la respuesta de corticosterona al estrés de natación forzada en animales neonatales de 25 días (apartado V.2), no encontramos efecto de dicho tratamiento en los machos, lo que concuerda con lo observado aquí en machos adultos. Hasta lo que nosotros conocemos existen relativamente pocos datos en la literatura respecto al papel del receptor  $\delta$  en la modulación de la respuesta adrenocortical al estrés. Sin embargo, como ya hemos indicado anteriormente, en los trabajos que hemos encontrado se sugiere una implicación principalmente del receptor  $\mu$ , más que del  $\delta$ , tanto en ratas (Degli Uberti y col. 1995), como en ratones (Hart y col. 1985, Kitchen y Rowan 1984). Nuestros resultados sugieren que el receptor  $\delta$  no juega un papel importante en la modulación de la actividad adrenocortical frente a estos estímulos estresantes, en ratas macho.

#### V.4.3. EFECTOS A LARGO PLAZO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL EN ANIMALES ADULTOS.

- Efectos del tratamiento neonatal con naltrindol sobre el comportamiento y la respuesta de corticosterona al estrés, en ratas adultas.

### **RESULTADOS**

#### *Tablero con agujeros.*

Los datos de los animales con tratamiento neonatal SS o NTI obtenidos en esta prueba fueron analizados mediante el *test* de Student. Este análisis no reveló efectos significativos del tratamiento neonatal sobre ninguno de los parámetros valorados en esta prueba (Tabla 5, Figuras 16 y 17).

#### *Laberinto en cruz.*

Recordemos que los animales, tratados neonatalmente con SS o NTI, fueron sometidos a esta prueba inmediatamente después de la finalización del tablero con agujeros. El *test* de Student aplicado a los datos obtenidos, no reveló efectos significativos del tratamiento neonatal sobre los porcentajes de entrada y tiempo en brazos abiertos o cerrados. No se observaron diferencias significativas en el número total de entradas a brazos, entre animales de distinto tratamiento neonatal. Sólo se observó un efecto residualmente significativo ( $p < 0,1$ ) en el tiempo total transcurrido en brazos, de manera que los animales tratados neonatalmente con NTI presentaron tiempos menores de permanencia en ellos (Tabla 6, Figura 18).

*Respuesta de corticosterona al estrés.*

El Anova de dos vías (factores: tratamiento neonatal (SS o NTI), protocolo experimental (basal, post-estrés) aplicado a los datos, reveló un efecto significativo producido por el protocolo experimental ( $p < 0,0001$ ). No se encontraron efectos significativos del tratamiento neonatal recibido ni interacción significativa entre factores. El análisis *post-hoc* encontró que los animales que fueron sometidos al estrés de natación forzada presentaron niveles de corticosterona en suero significativamente superiores a los animales que no nadaron, independientemente del tratamiento neonatal que hubieran recibido (suero salino o naltrindol) ( $p < 0,05$ ) (Tabla 7, Figura 19). No se encontraron efectos significativos del tratamiento neonatal sobre las concentraciones basales de corticosterona en suero (Tabla 7, Figura 19).

**TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)**  
**TABLERO CON AGUJEROS**  
**MACHOS ADULTOS**

TRATAMIENTO		PARÁMETROS						
NEONATAL	DE	DI	DT	PE	G	DEF	F.EXP.	TPO.EXP.
SS	150,1±5,5	81,8±6,7	231,9±7,1	27,7±2,7	0,4±0,2	2,0±0,6	10,5±1,7	18,7±3,4
NTI	156,7±6,3	81,5±3,4	237,7±6,9	22,2±2,5	0,7±0,2	2,3±0,6	9,5±1,1	20,9±3,6

Tabla 5. Los valores corresponden a la media  $\pm$  e.e.m de 20 animales. SS: suero salino, NTI: naltrindol. DE: deambulaci3n externa, DI: deambulaci3n interna, DT: deambulaci3n total, PE: postura erguida, G: *grooming*, DEF: defecaci3n, F.EXP.: frecuencia exploratoria, TPO.EXP.: tiempo de exploraci3n.

**TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)  
TABLERO CON AGUJEROS  
MACHOS ADULTOS**

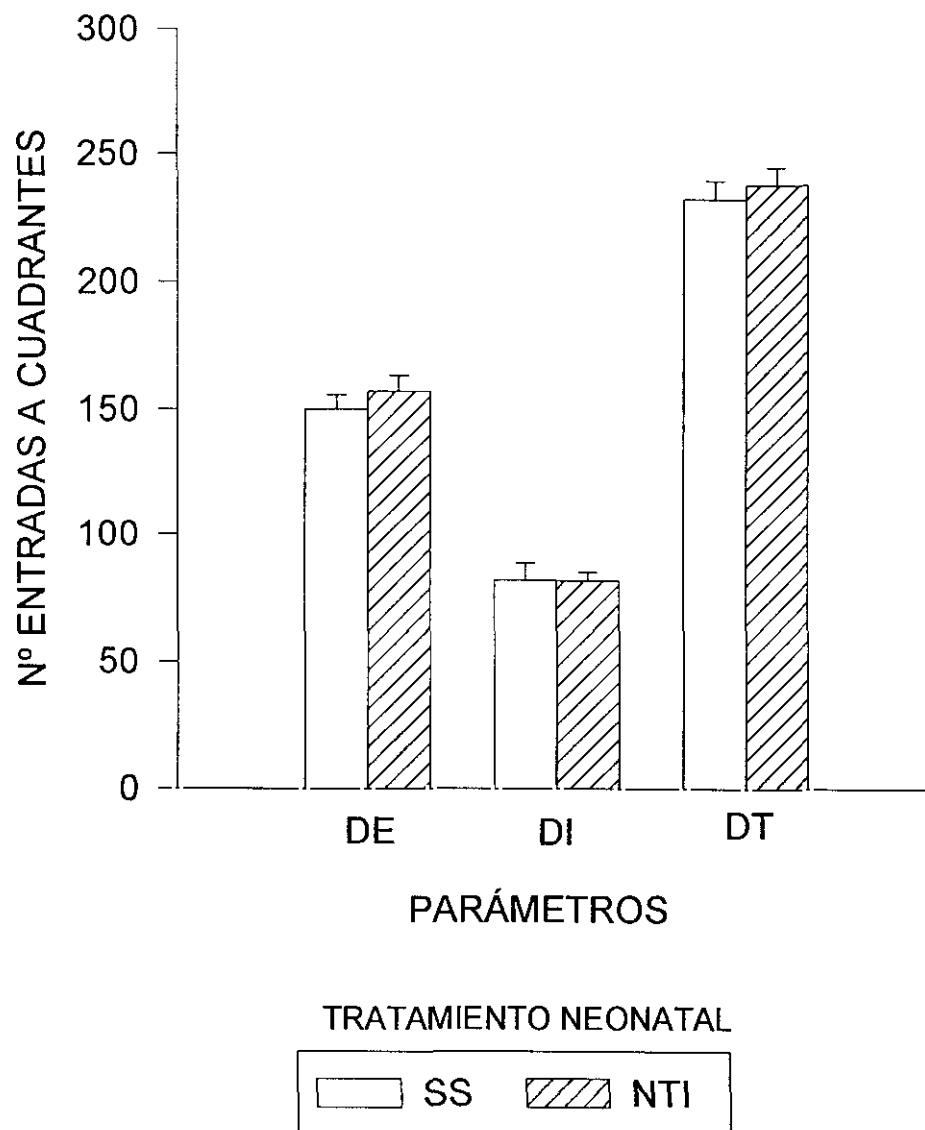


Figura 16. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 20 animales.  
DE: deambulacion externa; DI: deambulacion interna; DT: deambulacion total.  
SS: suero salino, NTI: naltrindol.

# TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19) TABLERO CON AGUJEROS MACHOS ADULTOS

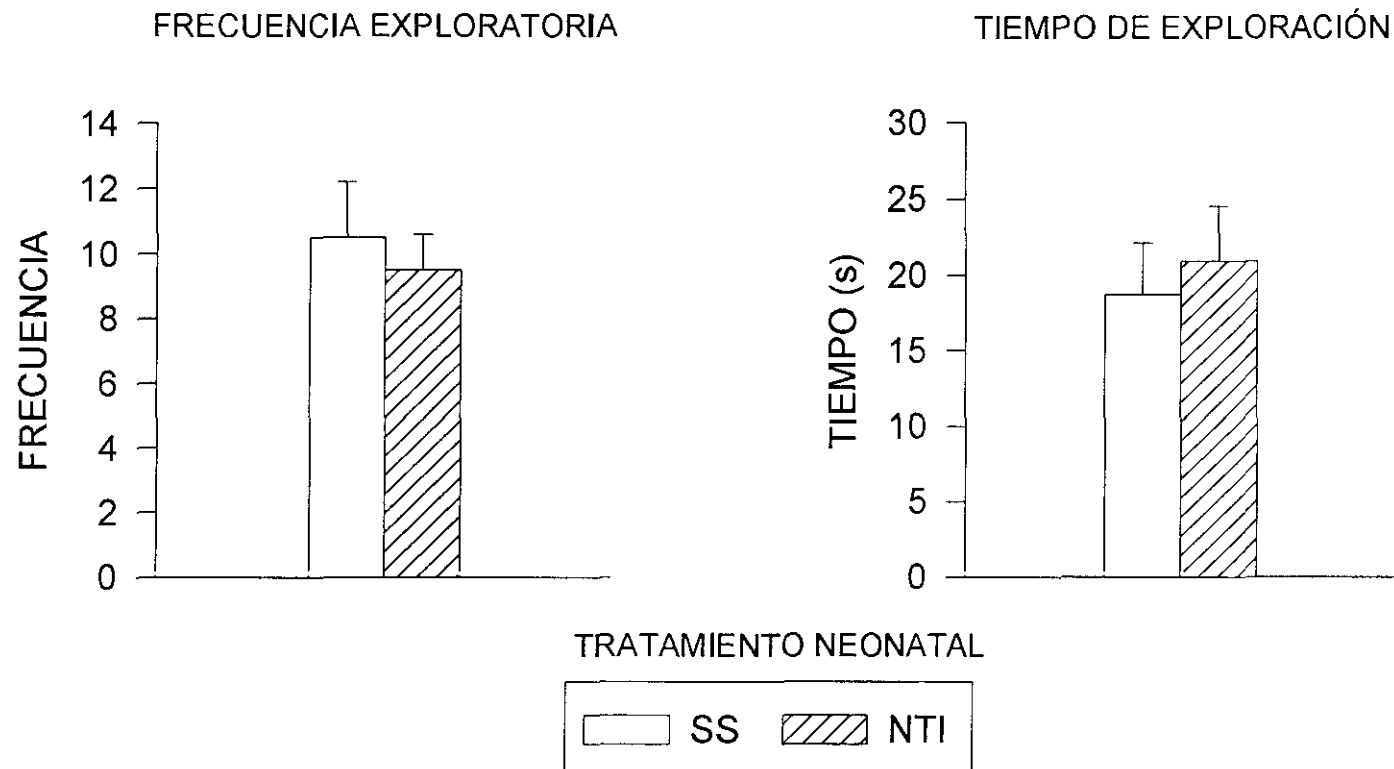


Figura 17. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 20 animales.  
SS: suero salino, NTI: naltrindol.

**TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19)**  
**LABERINTO EN CRUZ**  
**MACHOS ADULTOS**

TRATAMIENTO	PARÁMETROS					
NEONATAL	% Entradas a brazos abiertos	% Entradas a brazos cerrados	% Tiempo en brazos abiertos	% Tiempo en brazos cerrados	Entradas totales en ambos brazos	Tiempo total en ambos brazos
SS	16,3±4,0	83,7±4,0	20,3±5,3	79,7±5,3	13,4±0,6	165,9±4,7
NTI	15,8±3,2	84,2±3,2	17,8±4,3	82,2±4,3	13,8±0,7	149,5±7,5

Tabla 6. Los valores corresponden a la media ± e.e.m. de 14-16 animales. SS: suero salino, NTI: naltrindol.

# TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19) LABERINTO EN CRUZ MACHOS ADULTOS

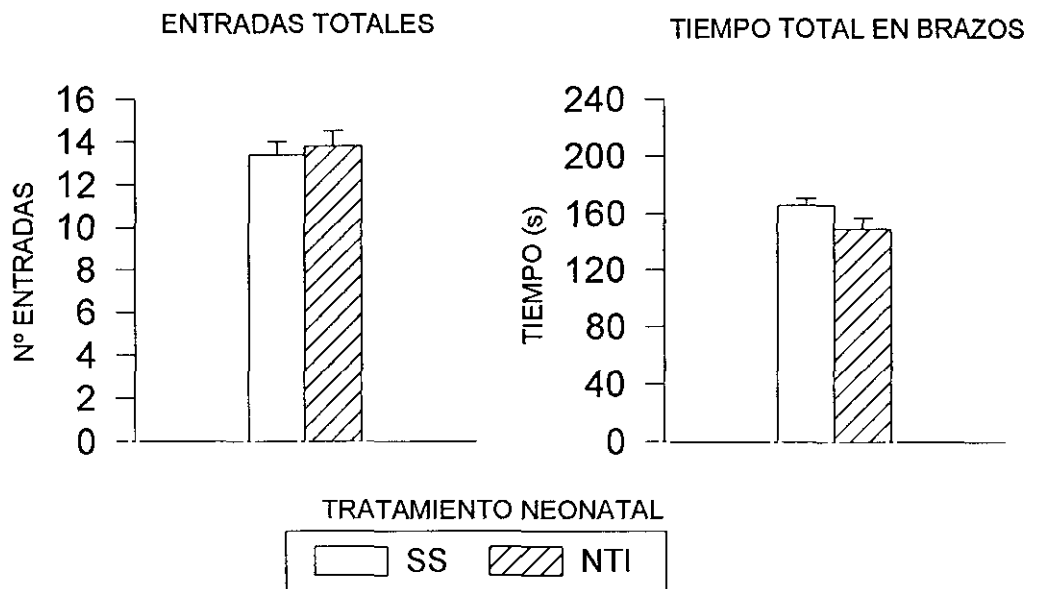
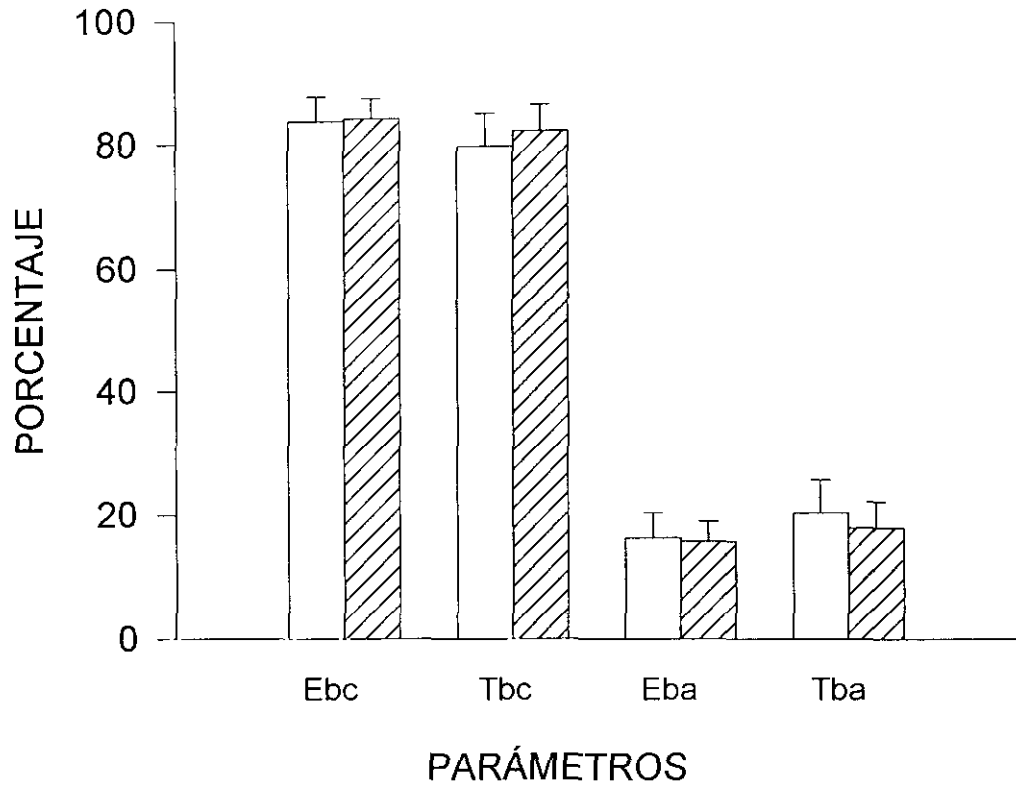


Figura 18. Los histogramas muestran la media  $\pm$  e.e.m. de 14-16 animales. Ebc: entradas a brazos cerrados; Tbc: tiempo en brazos cerrados. Eba: entradas a brazos abiertos; Tba: tiempo en brazos abiertos. SS: suero salino, NTI: naltrindol.

## EFECTOS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19), SOBRE LA RESPUESTA DE CORTICOSTERONA AL ESTRÉS, EN MACHOS ADULTOS

NIVELES DE CORTICOSTERONA (ng/ml)		
	BASAL	POST-ESTRÉS
SS	118,5 ± 14,0	332,2 ± 12,7 *
NTI	129,3 ± 23,1	331,4 ± 15,9

Tabla 7. Los valores corresponden a la media ± e.e.m. de 10 animales. SS: suero salino, NTI: naltrindol.  
\* p<0,05 frente a los niveles basales.

# EFFECTOS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍA 0-19) SOBRE LA RESPUESTA DE CORTICOSTERONA AL ESTRÉS EN MACHOS ADULTOS

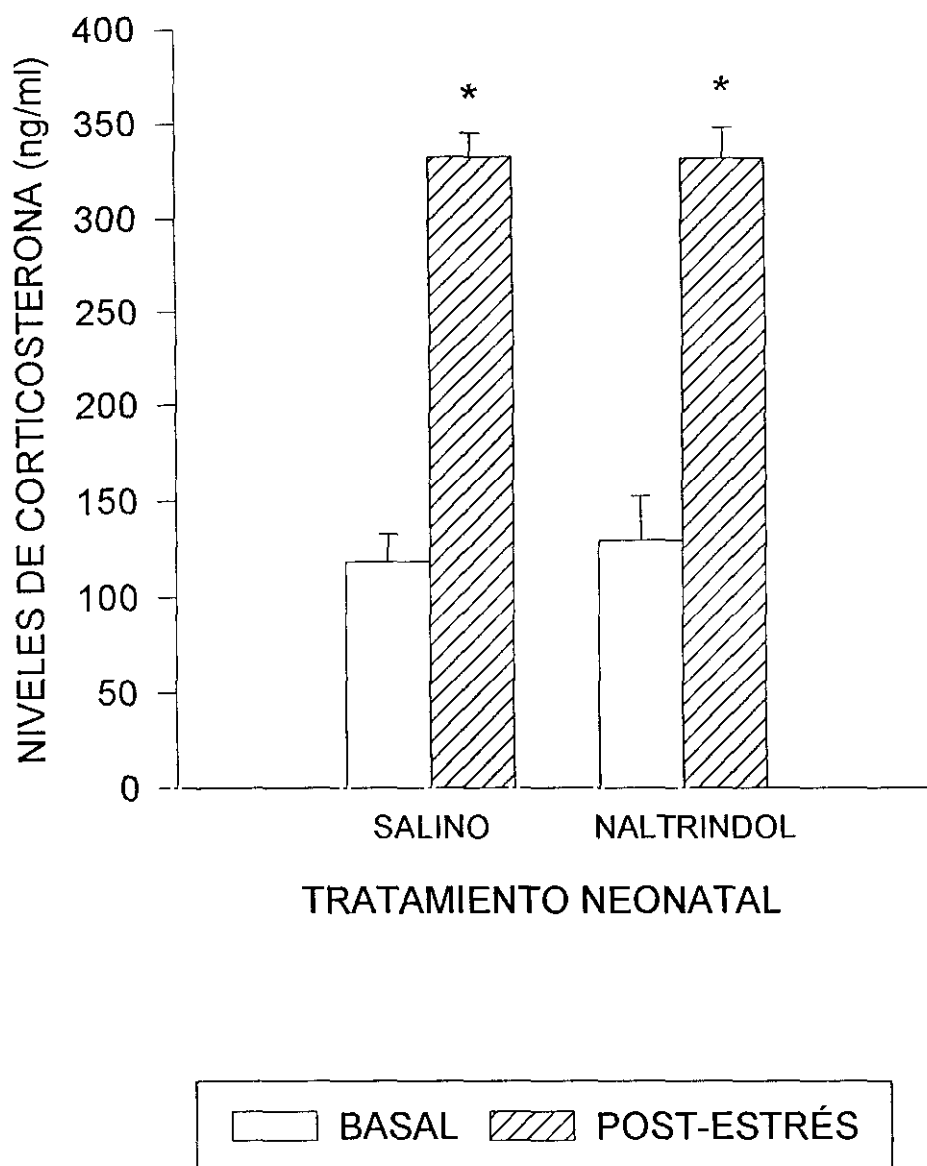


Figura 19. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 10 animales.  
\*  $p < 0,05$  frente a los niveles basales.

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados indican que la administración neonatal de naltrindol no produjo efectos significativos a largo plazo sobre el comportamiento de los adultos en las pruebas a que fueron sometidos (tablero con agujeros y laberinto en cruz).

Es reducido el número de trabajos en los que se han investigado las repercusiones de la administración neonatal de sustancias opioides, sobre las distintas respuestas emotivas en la edad adulta. En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, se estudiaron las respuestas al *test* de tablero con agujeros, campo abierto y laberinto en cruz, de adultos sometidos a un tratamiento crónico con naltrexona -antagonista opioide de carácter general- durante los primeros 21 días de vida postnatal. De los resultados obtenidos en la batería de pruebas utilizada, se dedujo que este tratamiento incrementó los niveles de ansiedad y emotividad de los animales, disminuyó su comportamiento exploratorio y no afectó significativamente su actividad locomotora (De Cabo y col. 1995). Estos datos, junto con los obtenidos por otros autores (Zagon y McLaughing 1985), indican que las acciones del tratamiento con naltrexona sobre el comportamiento, tienen efectos a largo plazo que se observan en la edad adulta. Por lo que se refiere a la administración de agonistas, la administración neonatal de met-enkefalina en la rata tiene un efecto facilitador del comportamiento en un laberinto complejo, cuando se les somete a la prueba en la edad adulta (Kastin y col. 1980). De la misma forma, la exposición neonatal a metadona, hace que las ratas adultas presenten una mayor actividad en diversas pruebas comportamentales (campo abierto, jaula de actividad, rueda de actividad, plataforma elevada) (Zagon y col. 1979). Sin embargo, se ha visto que los tratamientos pre- y postnatal con  $\beta$ -endorfina no influyen significativamente sobre la actividad en el campo abierto cuadrado de la rata adulta (Zadina y col. 1985). Por la bibliografía consultada y los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación, parece que la

manipulación de ciertos componentes del sistema opioide durante el período predeste afecta el comportamiento exploratorio, de forma que una estimulación del sistema potencia, y un bloqueo del sistema perjudica la actuación del animal adulto en ciertos ambientes (De Cabo y col. 1995, Katooh y col. 1990, Kastin y col. 1980). Sin embargo, nuestro tratamiento neonatal con naltrindol no produjo variaciones significativas a largo plazo en los parámetros indicativos del nivel de ansiedad y emotividad de los animales adultos, ni en los indicativos de actividad exploratoria y locomotora registrados en las pruebas comportamentales utilizadas. En otro estudio realizado en esta Tesis que ya hemos comentado (apartado V.4.1) encontramos que el tratamiento neonatal (día 0-19) con naltrindol produjo modificaciones marcadas en la actividad motora de animales neonatales de 20 días de edad. Los posibles efectos del bloqueo de los receptores  $\delta$  durante este período, tanto sobre el sistema opioide -receptores y péptidos- como sobre otros sistemas neuroquímicos relacionados, y sus consecuencias comportamentales, no parecen mantenerse hasta la edad adulta. Por tanto, podemos sugerir que no debe haber una alteración permanente en la actividad de los sistemas neurotransmisores potencialmente implicados en las respuestas valoradas, debido posiblemente a una "normalización" de dichos sistemas producida por cambios compensatorios durante el curso del desarrollo. Como expusimos en la discusión del apartado V.4.1., en un trabajo reciente se encontró que la administración de anticuerpos frente a met-enkefalina (ligando opioide que presenta una cierta selectividad relativa por el receptor  $\delta$ ) a ratas neonatales, sí inducía cambios comportamentales a largo plazo en los animales adultos (Ceballos y Fontenla 1999). El hecho de que por el contrario nuestro tratamiento neonatal con naltrindol no haya tenido efectos comportamentales a largo plazo podría deberse, al menos en parte, a una mayor vida media del anticuerpo. Así, una duración de acción relativamente más prolongada ofrecería un mayor margen para la inducción de cambios neurales permanentes en el sistema nervioso en desarrollo, lo que a

su vez facilitaría la observación de alteraciones neuroquímicas y comportamentales a largo plazo.

El que el tratamiento crónico con naltrexona durante el período predestete (día 0-21) afecte las respuestas comportamentales de los animales adultos (De Cabo y col. 1995), mientras que el tratamiento con naltrindol durante aproximadamente el mismo período (día 0-19) no produzca cambios a largo plazo, es atribuible, al menos en parte, a la diferente selectividad de los antagonistas opioides empleados, ya que la naltrexona es un antagonista de carácter general que puede mostrar una cierta selectividad por el receptor  $\mu$ , y el naltrindol es selectivo del receptor  $\delta$  opioide. La naltrexona produce un bloqueo funcional de los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ , y este antagonismo general debe tener consecuencias más drásticas y duraderas que el bloqueo selectivo del receptor  $\delta$  por naltrindol. Dicho de otra manera, el bloqueo de los tres receptores opioides, puede, en teoría, disminuir las probabilidades de cambios compensatorios que podrían resultar más viables cuando sólo se bloquea un tipo (el  $\delta$ ) de receptor. Cabe también interpretar que, a la dosis de naltrexona utilizada en nuestro anterior trabajo (1mg/kg) (De Cabo y col. 1995), este antagonista general mostrara una cierta selectividad relativa por el receptor  $\mu$ . Teniendo en cuenta la ausencia de efectos a largo plazo de nuestro tratamiento con el antagonista  $\delta$  selectivo naltrindol, podría sugerirse que es el receptor  $\mu$  el más implicado en la modulación de la respuesta comportamental al estrés a largo plazo.

En cuanto a la respuesta de corticosterona al estrés encontramos que, como era de esperar, el estrés de natación forzada produjo un incremento significativo en los niveles de corticosterona. Este aumento fue similar en los animales controles y en los tratados neonatalmente con naltrindol.

Como hemos indicado en la Introducción, se sabe que los péptidos opioides endógenos ejercen un papel fisiológico en la regulación de la actividad del eje HHA. Sin embargo, todavía se sabe poco sobre el papel que juegan los diversos tipos de receptores

opioides en el control de la secreción de corticosteroides. En nuestro estudio, el tratamiento neonatal con naltrindol, durante los primeros 19 días de vida postnatal, no modificó los niveles basales de corticosterona en suero en animales adultos, ni afectó a la respuesta de corticosterona al estrés de natación forzada. El papel del receptor  $\delta$  en la regulación de la función del eje HHA aún no está clarificado. En cuanto a la administración de agonistas exógenos, algunos autores encuentran que la administración de agonistas  $\delta$  produce estimulación del eje HHA (Bugajski y col. 1995, De Souza y Van Loon 1982, Iyengar y col. 1986), así se ha visto que tras la administración del agonista  $\delta$  DPDPE a ratas adultas se producen incrementos significativos en los niveles de corticosterona en suero y tras la administración repetida en dosis crecientes se produce tolerancia a este compuesto (González y col. 1991). Sin embargo, otros autores encuentran que los agonistas opioides  $\delta$  deprimen la función del eje HHA (Buckingham y Cooper 1987, Cover y Buckingham 1989). En cuanto a la administración de antagonistas, en estudios previos se ha observado que la administración de antagonistas  $\delta$  no tiene efecto sobre los niveles de corticosterona (Kitchen y Rowan 1984), y otros autores han encontrado que el bloqueo de receptores  $\delta$  no produce cambios significativos en las concentraciones de ACTH y corticosterona en plasma, lo que sugiere que los receptores  $\delta$  no participan en la regulación de la actividad del eje HHA (Cover y Buckingham 1989). Los resultados obtenidos en este apartado de la presente Tesis Doctoral están en la misma línea y concuerdan perfectamente con la ausencia de efectos a corto plazo del tratamiento crónico con naltrindol sobre la actividad adrenocortical en machos neonatales y adultos, lo que apoya la interpretación de que el receptor  $\delta$  no parece estar implicado en la modulación de la actividad del eje HHA en ratas macho.

#### V.4.4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL SOBRE LOS NIVELES DE MONOAMINAS EN DISTINTAS ÁREAS CEREBRALES DE ANIMALES NEONATALES. DIFERENCIAS SEXUALES.

### RESULTADOS

Los Anovas de dos vías (sexo, tratamiento) revelaron los siguientes resultados:

A la edad de 20 días, los análisis realizados con los valores obtenidos de NA no revelaron efectos significativos del sexo ni del tratamiento neonatal en ninguna de las áreas cerebrales en que fue valorado (Tabla 8). En cuanto al sistema dopaminérgico, los análisis revelaron un efecto significativo del sexo ( $p < 0,05$ ) en el hipotálamo, de forma que los machos presentaron concentraciones de DA mayores que las hembras, independientemente del tratamiento neonatal recibido (Tabla 8, Figura 21). El tratamiento con naltrindol no tuvo efectos significativos sobre los niveles de DA en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas, pero produjo un ligero incremento en las concentraciones de DA en la sustancia nigra ( $p = 0,185$ ) (Tabla 8, Figura 20). Los análisis realizados con los valores de DOPAC revelaron un efecto significativo del sexo ( $p < 0,05$ ) y residualmente significativo del tratamiento neonatal ( $p < 0,1$ ) en el caudado putamen. El análisis *post-hoc* encontró concentraciones de DOPAC superiores en los machos ( $p < 0,05$ ) (Tabla 8, Figura 21). El tratamiento con naltrindol tendió a incrementar la concentración del metabolito en este área. Los análisis realizados con el *turnover* DOPAC/DA, rindieron una interacción significativa entre factores en la sustancia nigra ( $p < 0,05$ ). El *test* de comparación múltiple encontró un *turnover* significativamente reducido en los machos tratados con naltrindol, pero no en las hembras (Tabla 8, Figura 20).

A la edad de 25 días, los análisis realizados con los valores obtenidos de NA no revelaron efectos significativos del sexo ni del tratamiento neonatal con naltrindol en ninguna de las áreas estudiadas. Tampoco se encontraron efectos significativos del sexo y del

tratamiento con naltrindol sobre las concentraciones de DA, aunque en la sustancia nigra el tratamiento neonatal presentó una  $p=0,161$  y la interacción entre factores  $p=0,140$ . A la vista de los datos parece que, en esta área, el tratamiento con naltrindol tiende a disminuir la DA en las hembras (Tabla 9). Los análisis realizados con los valores de DOPAC revelaron un efecto significativo del sexo ( $p<0,05$ ) en el hipotálamo. El análisis *post-hoc* encontró concentraciones superiores de este metabolito en los machos (Tabla 9, Figura 21). El tratamiento neonatal no tuvo efecto significativo en ninguna de las áreas, sin embargo en la sustancia nigra el análisis rindió un valor de  $p=0,167$  para este factor, y una interacción entre factores de  $p=0,162$ . Al igual que ocurría con la DA, el naltrindol parece que, en esta área, tiende a disminuir las concentraciones DOPAC en las hembras (Tabla 9). Los análisis realizados con el *turnover* DOPAC/DA revelaron un efecto significativo del sexo ( $p<0,05$ ) en el hipotálamo. El *post-hoc* encontró un *turnover* significativamente superior en los machos en esta área (Tabla 9, Figura 21).

En trabajos previos realizados sobre el desarrollo de sistemas monoaminérgicos en la rata se ha comprobado que los niveles de DA y NA cerebrales varían con la edad y que mientras en algunos casos los niveles van en aumento, en otros casos aumentan y más tarde disminuyen. Además el sentido de las diferencias sexuales puede invertirse a medida que los animales crecen (Siddiqui y Gilmore 1988, Siddiqui y Shah 1997). Por tanto, una vez establecidos los efectos del sexo y del tratamiento a cada edad, nos pareció interesante comprobar la evolución de los parámetros neuroquímicos con la edad de nuestros animales.

Los Anovas de dos vías (edad, tratamiento) realizados para cada sexo, rindieron los siguientes resultados:

En cuanto al contenido de NA se encontró tanto en machos como en hembras, un efecto residualmente significativo del factor edad en caudado putamen y sustancia nigra ( $p_s<0,1$ ) observándose una disminución en los niveles de esta amina entre los días 20 y 25. Además, en las hembras el análisis detectó un efecto significativo del tratamiento neonatal con naltrindol ( $p<0,05$ ) en el contenido de NA del caudado putamen, mostrando las hembras

tratadas menores niveles de NA que los controles, independientemente de la edad. Dado que no existieron diferencias significativas debidas a la edad, este análisis es capaz de detectar el efecto del tratamiento cuando se compara la media global (obtenida de ambas edades) de hembras controles frente a la media global de las tratadas (Figura 22). En cuanto al contenido de DA se observaron niveles significativamente superiores a los 20 días con respecto a los 25 días en la sustancia nigra de machos ( $p < 0,05$ ), mientras que en las hembras controles la tendencia fue opuesta (Figura 23). Sin embargo, en las hembras tratadas con naltrindol los valores tendieron a ser superiores el día 20 (interacción edad x tratamiento,  $p < 0,1$ ). En el caudado putamen tanto para machos ( $p = 0,06$ ) como para hembras ( $p < 0,05$ ), los niveles de DA fueron superiores el día 25 que el día 20 (Figura 23), y la misma tendencia se encontró en cuanto a los niveles de dopamina en hipotálamo de hembras. En cuanto a los niveles de DOPAC, se observó que el factor edad resultó significativo en sustancia nigra, siendo superior el nivel del metabolito a los 20 días tanto en machos ( $p < 0,001$ ) como en hembras ( $p < 0,05$ ). En el caso de las hembras, las diferencias entre edades fueron más marcadas en las tratadas neonatalmente con naltrindol (interacción tratamiento x edad,  $p = 0,1$ ). En el caso de los machos, se observó para el contenido en DOPAC en hipotálamo que la interacción edad x tratamiento fue residualmente significativa  $p = 0,1$ , de forma que los niveles del metabolito fueron superiores a los 25 días en el caso de los animales tratados con naltrindol, mientras que en los controles se encontró la tendencia opuesta. Como muestra la Figura 24, el cociente DOPAC/DA, se vio afectado significativamente por la edad tanto en caudado putamen como en sustancia nigra, mostrando tanto machos como hembras valores superiores a los 20 días con respecto al día 25 ( $p_s < 0,05-0,001$ ). En el hipotálamo de hembras también se observó un mayor cociente DOPAC/DA a los 20 días ( $p < 0,05$ ).

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON NALTRINDOL (DÍA 0-19) Y DEL SEXO  
SOBRE LOS NIVELES CEREBRALES DE NA, DA, DOPAC Y EL COCIENTE DOPAC/DA.  
20 DÍAS DE EDAD.**

		NA		DA		DOPAC		DOPAC/DA	
		SS	NTI	SS	NTI	SS	NTI	SS	NTI
HIPOTÁLAMO	MACHOS	15,82±1,83	17,19±1,46	7,22±0,95	6,90±0,75	0,75±0,12	0,55±0,08	0,11±0,01	0,10±0,02
	HEMBRAS	13,47±1,91	14,69±2,54	5,18±0,69	¶ 4,62±0,86	0,58±0,10	0,52±0,15	0,10±0,02	0,12±0,03
CAUDADO PUTAMEN	MACHOS	0,83±0,18	0,60±0,16	54,22±3,14	56,04±3,41	11,14±0,73	11,68±0,67	0,21±0,01	0,21±0,01
	HEMBRAS	0,66±0,07	0,51±0,08	52,68±3,75	51,90±5,02	8,42±0,70	¶ 10,68±0,95	0,18±0,01	0,21±0,01
SUSTANCIA NIGRA	MACHOS	2,99±0,40	2,83±0,20	12,95±1,32	15,65±1,88	3,69±0,40	3,54±0,40	0,27±0,02	0,23±0,01*
	HEMBRAS	3,26±0,26	3,13±0,43	13,21±0,91	15,14±2,33	3,20±0,31	3,53±0,54	0,23±0,01	0,26±0,02

Tabla 8. Los valores corresponden a la media ± e.e.m. de las concentraciones (ng/mg proteína) obtenidas de 8-10 animales.

\* p<0,05 frente al grupo correspondiente tratado con suero salino

¶ p<0,05 frente a los grupos de machos correspondientes.

# EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON NALTRINDOL (DÍA 0-19) SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO. MACHOS DE 20 DÍAS DE EDAD

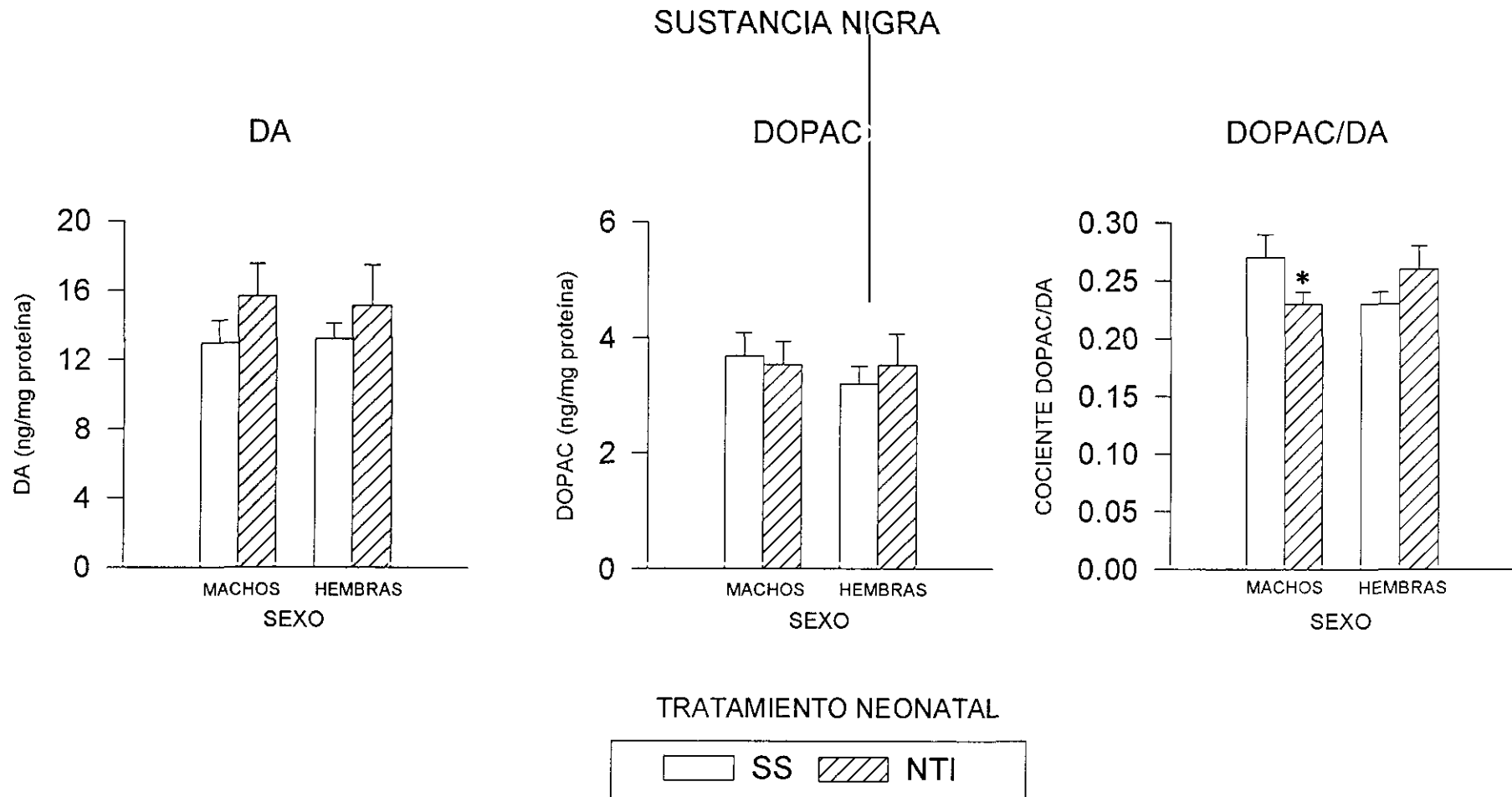
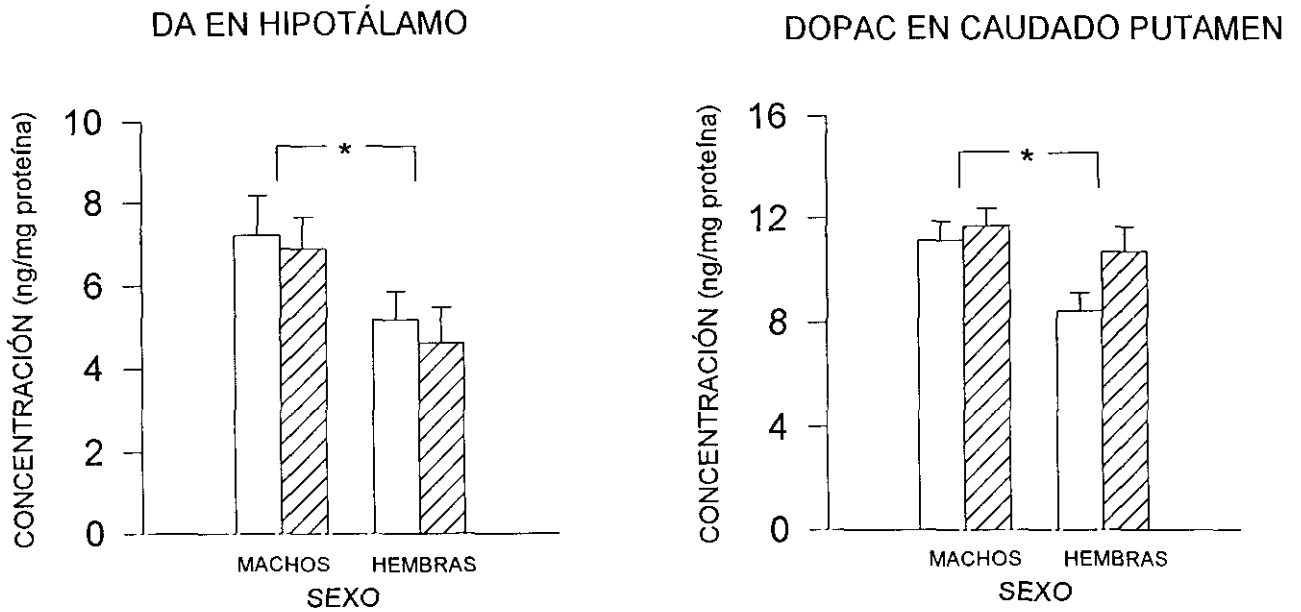


Figura 20. Los histogramas muestran la media  $\pm$  e.e.m. de 8-10 animales.

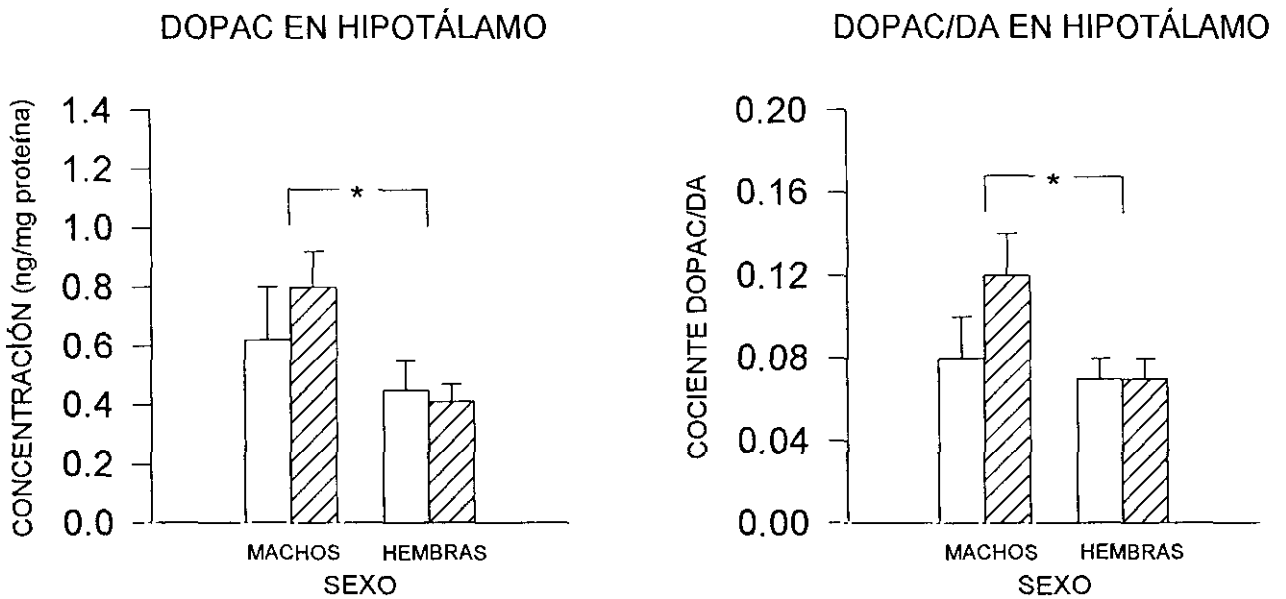
\*  $p < 0,05$  frente al grupo de machos tratados con suero salino.

# DIFERENCIAS SEXUALES EN EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO. ANIMALES NEONATALES

20 DÍAS DE EDAD



25 DÍAS DE EDAD



TRATAMIENTO NEONATAL

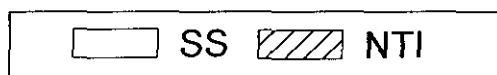


Figura 21. Los histogramas muestran la media  $\pm$  e.e.m. de 7-11 animales.  
\*  $p < 0,05$  diferencias sexuales.

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON NALTRINDOL (DÍA 0-19) Y DEL SEXO  
SOBRE LOS NIVELES CEREBRALES DE NA, DA, DOPAC Y EL COCIENTE DOPAC/DA.  
25 DÍAS DE EDAD.**

		NA		DA		DOPAC		DOPAC/DA	
		SS	NTI	SS	NTI	SS	NTI	SS	NTI
HIPOTÁLAMO	MACHOS	17,39±1,92	17,15±1,85	7,03±0,80	7,35±0,97	0,62±0,18	0,80±0,12	0,08±0,02	0,12±0,02
	HEMBRAS	15,64±3,02	13,63±1,30	7,25±1,57	5,88±0,56	0,45±0,10 ¶¶	0,41±0,06	0,07±0,01 ¶¶	0,07±0,01
CAUDADO PUTAMEN	MACHOS	0,52±0,09	0,51±0,06	64,52±4,57	60,85±4,05	10,23±0,81	10,56±1,12	0,16±0,01	0,17±0,01
	HEMBRAS	0,55±0,08	0,39±0,04	61,26±5,95	65,34±5,35	10,99±1,53	11,42±1,32	0,17±0,01	0,17±0,01
SUSTANCIA NIGRA	MACHOS	2,48±0,31	2,15±0,37	11,18±1,14	11,30±1,20	2,19±0,24	2,19±0,22	0,21±0,03	0,20±0,01
	HEMBRAS	2,60±0,34	2,58±0,44	14,29±2,44	9,43±1,21	2,83±0,50	1,88±0,25	0,21±0,02	0,20±0,01

Tabla 9. Los valores corresponden a la media ± e.e.m. de las concentraciones (ng/mg proteína) obtenidas de 7-11 animales.  
¶¶ p<0,05 frente a los grupos de machos correspondientes.

# EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON NALTRINDOL (DÍAS 0-19) SOBRE EL SISTEMA NORADRENÉRGICO. ANIMALES NEONATALES

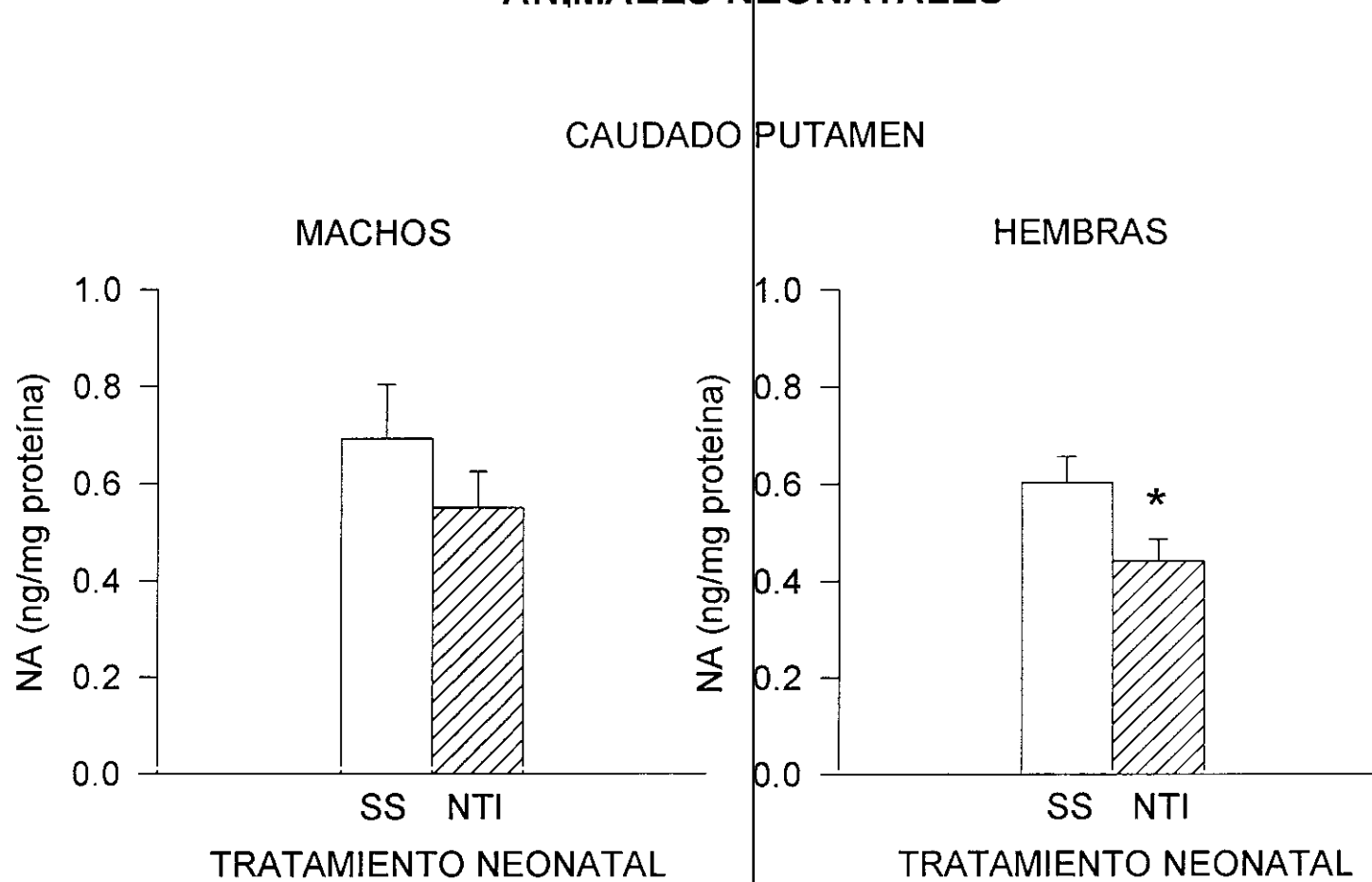


Figura 22. Los histogramas representan la media global, para cada tratamiento, de los datos obtenidos de animales de 20 y 25 días. SS:suero salino, NTI: naltrindol.

\*  $p < 0,05$  frente al grupo tratado con SS.

# EFFECTOS DE LA EDAD SOBRE EL CONTENIDO DE DOPAMINA

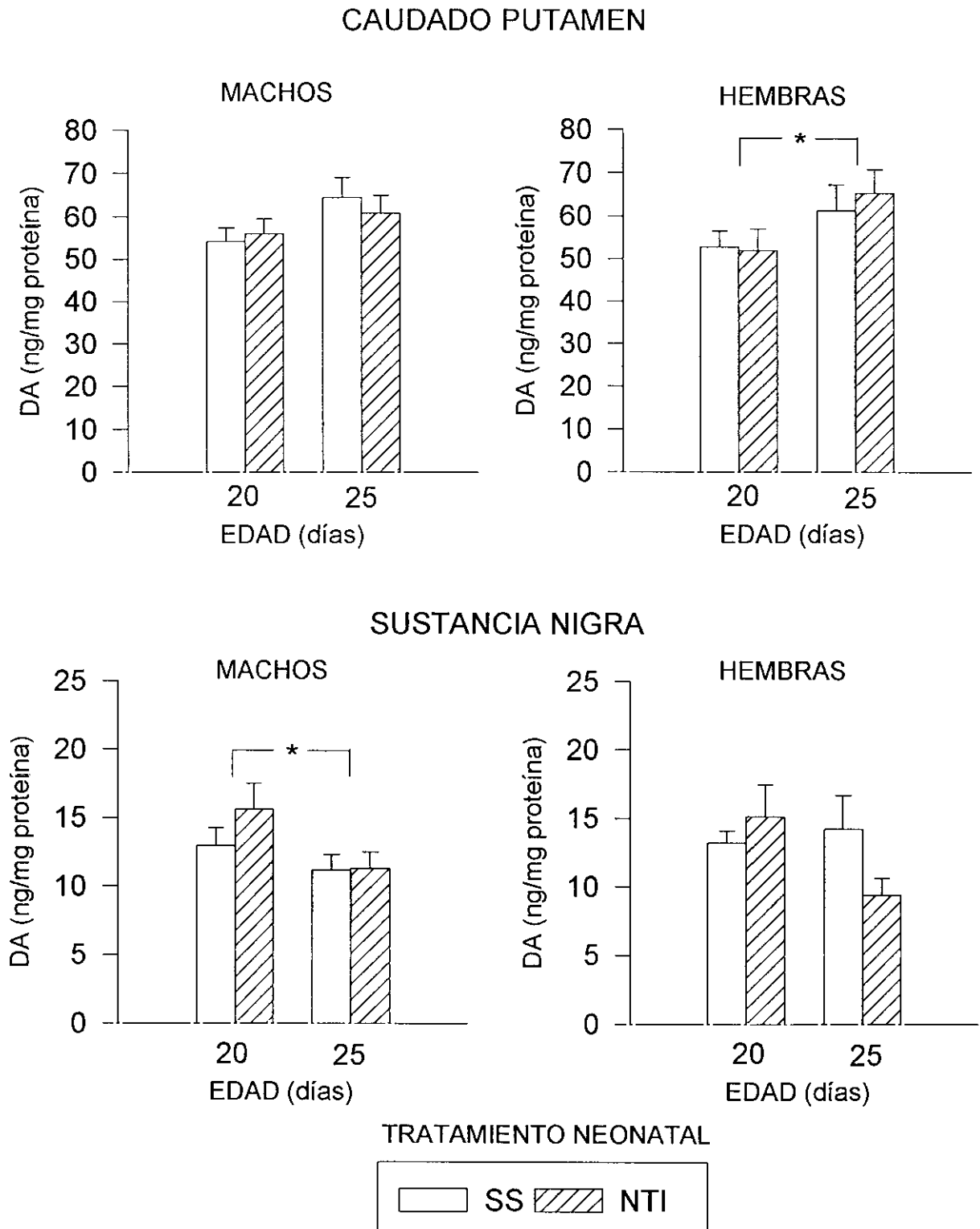


Figura 23. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 7-11 animales.  
\*  $p < 0,05$ , diferencias significativas entre 20 y 25 días.

# EFFECTOS DE LA EDAD SOBRE EL COCIENTE DOPAC/DA

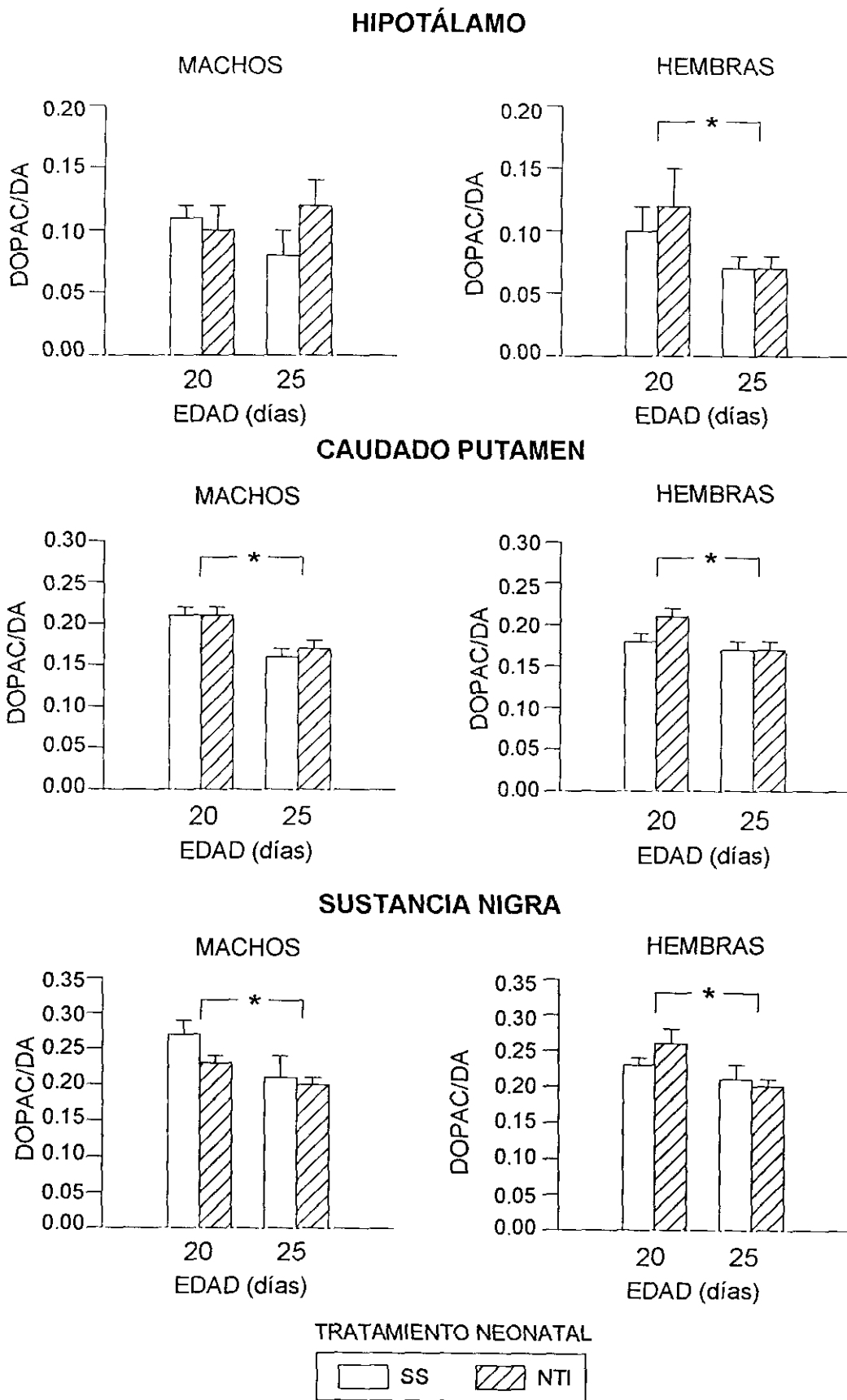


Figura 24. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 7-11 animales.  
\*  $p < 0,05$ , diferencias significativas entre edades.

## **DISCUSIÓN**

Los Anovas de dos vías (sexo, tratamiento) realizados en cada edad por separado, muestran que las hembras de 20 días presentaron concentraciones de DA en hipotálamo medio basal y de DOPAC en caudado putamen menores que los machos. A la edad de 25 días también se observaron unos niveles más bajos de DOPAC y un menor cociente DOPAC/DA en el hipotálamo medio basal de hembras. Estos análisis no detectaron sin embargo diferencias sexuales en el contenido de NA.

En estudios previos realizados por nuestro grupo encontramos diferencias sexuales en el sistema dopaminérgico estriatal en ratas de 22 días, mostrando los machos un contenido de HVA y un cociente HVA/DA incrementados con respecto a las hembras. Sin embargo, en aquel trabajo no encontramos diferencias sexuales ni en los niveles de DA ni en los niveles de DOPAC a los 7, 14 ó 22 días de edad (De Cabo y col. 1994). Las aparentes discrepancias con respecto a lo encontrado en el presente estudio en cuanto a los niveles de DA y DOPAC, podrían ser atribuibles al diferente método de disección empleado y/o a las diferentes edades estudiadas. Sin embargo, tomados en conjunto, los datos parecen indicar que existen diferencias sexuales en la funcionalidad del sistema dopaminérgico durante las etapas tempranas del desarrollo.

Las neuronas dopaminérgicas constituyen uno de los sustratos neurales de acción de los esteroides sexuales (para revisión ver Maggi y Pérez 1995), no sólo en adultos sino también durante el desarrollo, donde éstos ejercen un efecto epigenético importante sobre la diferenciación sexual de la funcionalidad cerebral (Arnold y Gorski 1984, Diamond 1987). Hay que tener en cuenta que es durante el período perinatal cuando tiene lugar la diferenciación sexual del cerebro en la rata (Weisz y Ward 1980), por lo tanto parece lógico pensar que las diferencias sexuales encontradas por nosotros en el sistema dopaminérgico sean atribuibles a diferentes niveles de hormonas sexuales circulantes y al efecto de éstas sobre la diferenciación sexual cerebral. Resultados previos confirman que los contenidos de

noradrenalina y dopamina en el cerebro de rata, sobre todo en áreas sexualmente dimórficas como amígdala e hipotálamo, son afectados por exposición perinatal a andrógeno y que el sentido de las diferencias sexuales en niveles de catecolaminas puede invertirse durante el desarrollo (Siddiqui y Gilmore 1988, Siddiqui y Shah 1997). Por otra parte también existen estudios que apuntan la existencia de diferencias sexuales sutiles en el número y distribución de neuronas inmunorreactivas a tiroxina hidroxilasa en edades tempranas del desarrollo (Reisert y col. 1990, Engele y col. 1987) que parecen preceder al clásico período de diferenciación sexual del cerebro en la rata (Reisert y col. 1989, Engele y col. 1989). Se ha informado en un trabajo reciente que las concentraciones de NA y DA en amígdala e hipotálamo de machos con castración simulada y hembras tratadas con andrógeno en el período neonatal eran más altas que las de machos castrados y hembras controles a los 25 días de edad (Siddiqui y Shah 1997). En lo que se refiere al sistema dopaminérgico nuestros datos coinciden en parte con esos resultados ya que también en nuestro caso se observaron mayores niveles de dopamina hipotalámicos en machos que en hembras, aunque a la edad de 20 días. Además de las diferencias sexuales observadas en los niveles de DA y DOPAC a la edad de 25 días ya comentadas al principio de esta discusión, también hemos encontrado que el sexo afecta a la evolución del sistema dopaminérgico entre los días 20 y 25. Así, el contenido de DA en sustancia nigra disminuye entre los días 20 y 25 en machos, pero no en hembras, y el cociente DOPAC/DA hipotalámico disminuye con la edad en hembras, pero no en machos.

En general, el efecto de la edad sobre los diferentes parámetros evaluados en el sistema dopaminérgico se reflejó en una disminución de los valores de los diferentes parámetros entre 20 y 25 días. Sin embargo, se encontró una excepción en el caudado putamen donde el contenido de dopamina fue mayor a los 25 días, tanto en machos como en hembras. Estos datos concuerdan con observaciones de otros autores de las que se deduce que los contenidos de catecolaminas cerebrales pueden fluctuar a lo largo del desarrollo y que estas fluctuaciones pueden depender del sexo y de la región encefálica

(Siddiqui y Gilmore 1988, Siddiqui y Shah 1997). En cuanto al contenido de noradrenalina, el efecto de la edad no fue significativo, aunque los niveles de esta catecolamina tendieron a ser menores a los 25 días que a los 20 días en caudado putamen y sustancia nigra. Debemos tener en cuenta, al comparar nuestro trabajo con los de Siddiqui y colaboradores, que los animales de nuestro estudio fueron manipulados (pesados e inyectados) durante el período predestete. Teniendo en cuenta los diversos efectos que, como hemos visto a lo largo de esta Tesis, produce la manipulación, es muy posible que también en este caso haya afectado a los sistemas catecolaminérgicos y muy probablemente de forma distinta en machos y hembras. Es obvio que al carecer de animales no manipulados en este estudio, no podemos afirmar esto con rotundidad, pero nos parece una hipótesis plausible. En este sentido, se ha encontrado que el estrés materno durante la gestación alteró los metabolitos de DA y NA en cerebro anterior-hipotálamo de las crías hembras, tanto en el período fetal como en el neonatal. Los autores de este estudio indican efectos tanto del estrés materno como del sexo (Herrenkohl y col. 1988).

No hemos encontrado interacción significativa entre el tratamiento neonatal y la edad en ningún caso. Sin embargo, más adelante comentaremos algún efecto o tendencias debidas al tratamiento que se detectaron en los análisis que incluían la edad como factor.

Existe un gran número de evidencias a partir de estudios bioquímicos y autorradiográficos (Illes y Jackisch 1991, Murrin y col. 1980, Nakazawa y col. 1991, Pollard y col. 1977), así como fisiológicos (Kamata 1987, Rosecrans y col. 1977, Steece y col. 1986, Yaksh y Tyce 1979) y electrofisiológicos (Finnerty y Chan 1981, Hommer y Pert 1983, Jurna 1981) realizados en la edad adulta, que indican claramente la coexistencia e interrelaciones funcionales recíprocas entre los sistemas monoaminérgicos y el SOE en diversas regiones encefálicas. Los efectos de las sustancias opioides sobre los sistemas de monoaminas, parecen depender de la región encefálica concreta, del tipo de receptor implicado y en ocasiones también de la ruta de administración. En concreto, diversos datos indican que existen relaciones entre el sistema dopaminérgico y el receptor  $\delta$ -opioide que podrían jugar

un papel importante en los efectos que ejercen los agonistas de este receptor sobre la actividad motora, así como en sus propiedades de refuerzo. Diversos estudios ponen de manifiesto la influencia de distintos antagonistas dopaminérgicos sobre la actividad motora mediada por receptores  $\delta$  (Longoni y col. 1991, Maldonado y col. 1990, Spina y col. 1998). Se ha observado que antagonistas dopaminérgicos, especialmente de los receptores  $D_1$ , atenúan la estimulación comportamental producida por agonistas  $\delta$  (Longoni y col. 1991, Spina y col. 1998). Otros autores han encontrado que la administración crónica de antagonistas  $D_1$  no altera la hiperlocomoción producida por la inyección del inhibidor del catabolismo de las encefalinas kelatorfan en el núcleo accumbens de ratas, sin embargo, antagonistas  $D_2$  y no selectivos pero preferenciales de los  $D_2$ , como el haloperidol, produjeron un incremento de este efecto (Maldonado y col. 1990). También se ha encontrado un aumento en la respuesta motora mediada por opioides endógenos, tras lesiones dopaminérgicas en el núcleo accumbens, en las que están implicados receptores  $\mu$  y  $\delta$  (Churchill y col. 1998). Otros estudios en rata indican que la actividad motora inducida por cocaína es potenciada por DPDPE y que este agonista  $\delta$  también potenció el aumento de actividad locomotora producido por un inhibidor selectivo de la recaptura de dopamina (Waddell y Holtzman 1998). Además, las propiedades de refuerzo del DPDPE en ratones, valorada en la prueba de condicionamiento preferencial al sitio (*place preference*), resulta abolida por pretratamiento con un antagonista selectivo del receptor  $D_1$  dopaminérgico (Suzuki y col. 1996). La zona externa del núcleo accumbens parece ser uno de los sitios donde podrían darse las interacciones funcionales entre el receptor  $\delta$ -opioides y el sistema dopaminérgico ya que, en esta zona, los agonistas  $\delta$ -opioides pueden modular directamente la liberación de dopamina, así como las respuestas postsinápticas en determinadas neuronas que reciben *input* dopaminérgico y además controlar la secreción presináptica de otros neurotransmisores cuya liberación puede influir o ser influida por la dopamina extracelular (Svingos y col. 1999). La ruta nigroestriatal es otro lugar claro para este tipo de

interacciones. En el tallo cerebral se ha encontrado una densa inervación de fibras inmunoreactivas al receptor  $\delta$  en diversos núcleos incluyendo la sustancia nigra (Arvidsson y col. 1995). También existe una densa población de receptores  $\delta$  en el estriado, y se ha comprobado que los agonistas de estos receptores pueden inducir alteraciones en la transmisión dopaminérgica en esta área (Pasternak y Wood 1986).

Existe evidencia de un posible efecto de los agonistas opioides sobre el sistema dopaminérgico durante diversas edades del desarrollo postnatal. En concreto se ha observado, que la administración de morfina produjo incrementos significativos de los niveles de DOPAC estriatales a partir del sexto día de vida postnatal (Roth y col. 1980). Un tratamiento crónico con naltrexona durante el período predestete, causó alteraciones en los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos en ratas neonatales (De Cabo y col. 1994). Otros autores no han sido capaces de encontrar modificaciones en los niveles de NA, DA o 5-HT en diversas regiones del encéfalo (entre ellas cuerpo estriado, mesencéfalo e hipotálamo) por tratamiento crónico con naloxona durante los 21 primeros días de vida, en ratas de 22 días (Bardo y col. 1992), posiblemente debido a que la naloxona produce un bloqueo opioide de menor duración que la naltrexona. En nuestro anterior trabajo en el que utilizamos un tratamiento crónico con naltrexona, el sistema dopaminérgico quedó afectado únicamente a las edades más tempranas estudiadas (7 y 14 días), mientras que un día después de la finalización del tratamiento (día 22), no se encontraron efectos del mismo (De Cabo y col. 1994), y tampoco en la edad adulta (Viveros y col. 1995).

Los primeros terminales axónicos que poseen actividad tiroxina hidroxilasa alcanzan el caudado putamen entre los días 14 y 15 del período embrionario, originados en la sustancia nigra. Los receptores dopaminérgicos  $D_2$  son funcionales el día 15 de vida prenatal, su número incrementa desde el día 18 prenatal al 30 postnatal así como su afinidad. En el nacimiento los receptores  $D_1$  están presentes en el estriado, y aumentan hasta el día 40, con un pico marcado el día 15, coincidiendo con la actividad espontánea

motora mayor (Fernández Ruiz y col. 1992). Mediante estudios de hibridación *in situ*, se ha detectado RNAm para el receptor  $\delta$ -opioide en núcleo accumbens y estriado dorsal de ratas en el día 21 de gestación. En el día 8 postnatal se detectó RNAm para el receptor  $\delta$  en células grandes del estriado, posiblemente colinérgicas (Georges y col. 1998) lo que sugiere una posible modulación por ligandos endógenos  $\delta$ -opioides de neuronas colinérgicas estriatales. La expresión temprana de RNAm para el receptor  $\delta$ -opioide en áreas cerebrales relacionadas con la regulación de la función motora sugiere que ya desde el período neonatal pueden existir interacciones funcionales entre dicho receptor y el sistema dopaminérgico nigroestriatal que estén implicadas en la modulación de la actividad motora.

De nuestros estudios se deduce que el tratamiento con naltrindol afectó significativamente al cociente DOPAC/DA en la sustancia nigra, en machos de 20 días de edad, lo que sugiere una interacción funcional entre el receptor  $\delta$  y el sistema dopaminérgico en esta región. Está bien establecido que las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales juegan un papel facilitador en la elaboración de patrones de locomoción y comportamientos estereotipados (Bloom y col. 1988). Teniendo en cuenta estas interacciones, podríamos sugerir que el menor cociente DOPAC/DA encontrado en la sustancia nigra de los machos de 20 días tratados con naltrindol y que es reflejo de niveles incrementados de DA en este área, podría relacionarse con la hiperactividad previamente referida (apartado V.4.1) encontrada en machos de la misma edad, sometidos a este mismo tratamiento. Otros autores han encontrado cambios a nivel motor en paralelo a cambios en la actividad dopaminérgica nigroestriatal en animales expuestos perinatalmente a cannabinoides (Romero y col. 1995ab). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que el tratamiento neonatal afecte a otras neuronas no dopaminérgicas, localizadas en otras áreas incluso no estriatales, que también están involucradas en el control del comportamiento motor (Bloom y col. 1988, Simon y LeMoal 1984). Los efectos del tratamiento crónico con naltrindol sobre el sistema dopaminérgico nigroestriatal ya no aparecen a los 25 días de

edad en machos y recordemos que el tratamiento neonatal con naltrindol tampoco modificó la actividad del animal adulto. Estos resultados sugieren que los sistemas funcionales responsables de los efectos producidos tanto sobre la actividad motora como sobre el sistema dopaminérgico nigroestriatal por el bloqueo de los receptores  $\delta$ , se “activan” temporalmente, es decir los cambios compensatorios que presumiblemente se producen en dichos sistemas no parece que se mantengan a largo plazo. Otros autores han encontrado que la exposición perinatal a hashish induce una serie de efectos (disminuciones de actividad de tirosina hidroxilasa y en actividad locomotora y aumentos en densidad de receptores dopaminérgicos  $D_1$ ) que se observan en animales inmaduros pero que desaparecen en los machos adultos, mientras que el aumento inducido en la densidad de receptores  $D_2$  por el tratamiento sí se mantuvo hasta la edad adulta (Fernández-Ruiz y col. 1996).

En cuanto a otras tendencias (no efectos significativos) inducidas por el tratamiento con naltrindol sobre el sistema dopaminérgico, en el caso de los machos observamos que el tratamiento indujo un ligero aumento en los niveles de DOPAC hipotalámicos entre los días 20 y 25. En cuanto a las hembras, el tratamiento con naltrindol, tendió a disminuir tanto los niveles de DA como los de DOPAC en la sustancia nigra, entre los días 20 y 25.

Que el efecto significativo del tratamiento con naltrindol sobre el sistema dopaminérgico se haya manifestado sólo en los machos coincide con la hipótesis de que las neuronas dopaminérgicas durante el desarrollo podrían ser más sensibles a factores epigenéticos en este sexo. Otros autores también han encontrado dimorfismo sexual en los efectos producidos por la administración perinatal de THC (tetrahidrocannabinol) sobre el sistema dopaminérgico en animales en desarrollo (Fernández-Ruiz y col. 1996), de forma que se observó una mayor sensibilidad del sistema dopaminérgico a la exposición perinatal con cannabinoides en los machos. También se ha observado una sensibilidad diferencial,

mayor en los machos, frente a los efectos de otras drogas de abuso (para revisión ver Fernández-Ruiz y col. 1992).

En otros apartados de esta Tesis Doctoral ya hemos discutido la mayor vulnerabilidad de los machos en cuanto a los efectos de la manipulación neonatal sobre la respuesta a morfina y la actividad adrenocortical al estrés. Éstas diferencias sexuales, así como otras que se han discutido a lo largo del trabajo, parecen ser atribuibles a la influencia de los esteroides gonadales, ya que tanto la manipulación como los tratamientos farmacológicos utilizados en este trabajo se han aplicado durante un período crítico para la diferenciación sexual del cerebro.

Existen relativamente pocos datos sobre interacciones entre el receptor  $\delta$  opioide y el sistema noradrenérgico, sobre todo durante el período neonatal. En un trabajo reciente hemos encontrado que los efectos antinociceptivos y simpaticolíticos de la clonidina en ratas neonatales son afectados por un tratamiento con naltrindol idéntico al empleado en este trabajo, lo que sugiere una interacción funcional entre los receptores  $\alpha_2$  adrenérgico y  $\delta$  opioide (Alberti y col. 1999). Algunos datos sugieren que los tres tipos principales de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ) pueden ejercer una influencia inhibitoria sobre la neurotransmisión noradrenérgica hipotalámica aproximadamente en el momento en que se da un aumento de liberación de hormona luteinizante (Yilmaz y Gilmore 1999). Mediante estudios ultraestructurales en rata, se ha observado que en el *locus coeruleus* el receptor  $\delta$  puede jugar un papel en la modulación presináptica de la liberación de neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores y también se ha sugerido la implicación del receptor  $\delta$  en la autorregulación de la liberación de met-enkefina desde terminales axónicos en esta región (Van Bockstaele y col. 1997). En cultivos de neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* preparadas a partir de cerebros de embriones de ratas, se ha observado que estas neuronas parecían contener receptores  $\mu$  que ejercen efectos inhibitorios sobre la liberación de NA mientras que los resultados no sugerían implicación del receptor  $\delta$ . Así, la liberación

inducida de NA fue inhibida selectivamente por un agonista  $\mu$  y esta respuesta fue antagonizada por naloxona. Sin embargo, un agonista del receptor  $\delta$  no afectó la liberación de la catecolamina (Ronken y col. 1993).

Diversos estudios ponen de manifiesto que distintos estímulos estresantes activan el sistema noradrenérgico en distintas áreas cerebrales en la rata (Stone 1975). Así, se ha visto que el estrés psicológico incrementa el *turnover* de NA, especialmente en el hipotálamo y la amígdala (Iimori y col. 1982). Además, se ha encontrado que la naloxona potencia el incremento en el *turnover* de NA encontrado en hipotálamo, amígdala y tálamo inducido por estrés de inmovilización en ratas (Tanaka y col. 1982). En general, se ha sugerido que un incremento en el *turnover* de NA en estas áreas está implicado en las respuestas emocionales de ratas expuestas a agentes estresantes (Tanaka y col. 1981, 1982). El que nuestro tratamiento con naltrindol no haya modificado los niveles de NA en hipotálamo, podría relacionarse con los resultados obtenidos en el apartado V.4.1. de esta Tesis, que indican que el mismo tratamiento neonatal no modificó sustancialmente la emotividad de machos de 20 días de edad. El único efecto significativo del tratamiento con naltrindol en los niveles de NA se encontró en el caudado putamen de hembras, de forma que considerando globalmente las dos edades, las tratadas con naltrindol mostraron niveles inferiores que las controles.

En resumen, este estudio ha revelado diferencias sexuales y diferencias entre animales de 20 y 25 días que afectan sobre todo al sistema dopaminérgico y cuya manifestación parece ser diferente en distintas regiones encefálicas. El tratamiento neonatal con naltrindol afectó de forma significativa en el caso de los machos al cociente DOPAC/DA en sustancia nigra a los 20 días de edad, y en el caso de las hembras al contenido de NA en el caudado putamen. Así pues, los efectos del tratamiento también se ven influidos por el sexo, la región encefálica y la edad de los animales.

## V.5. EVOLUCIÓN PONDERAL

### RESULTADOS

Como indicamos en el apartado IV.7, se realizaron análisis tanto de los datos de pesos absolutos como de las tasas de crecimiento ( $\times$  veces el peso al nacer). Mediante este método (análisis de la tasa de crecimiento) pretendimos obviar la posible influencia que pudieran tener las pequeñas diferencias en peso el día 0 (día de nacimiento) y que por supuesto no podían deberse al tratamiento neonatal, dado que el peso el día 0 era registrado antes de aplicar la primera inyección.

Así, se analizaron los pesos registrados durante el período de tratamiento neonatal (días 0 a 19) mediante Anovas de dos vías para medidas repetidas (por tratarse de pesos de los mismos animales medidos a varios tiempos) con los factores tratamiento neonatal y edad y Anovas con los factores sexo y edad. Consideramos suficiente realizar los análisis de los pesos a 5 edades diferentes (día 0, 5, 10, 15 y 19). Se realizaron análisis análogos con la tasa de crecimiento.

En la tabla 10 se presentan los valores medios de los pesos de los animales de los días 0 a 19. Estas medias se han calculado a partir de los datos de pesos obtenidos de animales pertenecientes a una selección de 23 camadas diferentes nacidas en distintas épocas del año. Como se observa en la tabla, se presentan medias para 56-60 animales por grupo experimental. Por limitaciones del programa informático hemos tenido que disminuir el número de animales para realizar los análisis estadísticos, de modo que hemos eliminado los pesos de algunos animales aleatoriamente, quedándonos con un tamaño de muestra de 39-40 animales.

*Pesos corporales absolutos (día 0-19)*

El Anova de dos vías para medidas repetidas (tratamiento neonatal, edad) con el peso corporal como variable, mostró en ambos sexos un efecto significativo ( $p < 0,001$ ) de la edad y el análisis *post-hoc* reveló, como era de esperar, diferencias entre todas las edades (días 0, 5, 10, 15, 19). El tratamiento neonatal con naltrindol no tuvo efecto significativo sobre el peso corporal de los animales (Figura 25).

El Anova de dos vías para medidas repetidas (sexo, edad) realizado en animales tratados neonatalmente con suero salino mostró efectos significativos del factor edad ( $p < 0,001$ ). El análisis *post-hoc* reveló diferencias entre todas las edades, de forma que, lógicamente, los pesos corporales se incrementaron con la edad. Este mismo análisis realizado a los animales tratados neonatalmente con naltrindol, reveló un efecto significativo de la edad ( $p < 0,001$ ) (incremento de peso con la edad) y del sexo ( $p < 0,01$ ), presentando las hembras pesos corporales ligeramente disminuidos con respecto a los machos (Figura 25).

*Tasa de crecimiento (día 0-19)*

El Anova de dos vías para medidas repetidas (tratamiento neonatal, edad) con la tasa de crecimiento como variable mostró un efecto significativo ( $p < 0,001$ ) del factor edad y el análisis *post-hoc* reveló diferencias entre todas las edades (días 5, 10, 15 y 19), mostrando ambos sexos un incremento de la tasa de crecimiento con la edad. El tratamiento neonatal no tuvo un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento de los animales, aunque especialmente a partir del día 10 se puede observar una tendencia de las hembras tratadas con naltrindol a presentar tasas de crecimiento ligeramente superiores a las tratadas con suero salino (Figura 26).

El Anova de dos vías para medidas repetidas (sexo, edad) demostró, para el grupo de animales tratados neonatalmente con suero salino, la existencia de un efecto significativo del factor edad ( $p < 0,001$ ) de manera que observamos que la tasa de crecimiento incrementó significativamente a cada punto de edad analizado, en ambos sexos. Este mismo análisis

realizado a animales tratados neonatalmente con naltrindol reveló efectos significativos del sexo ( $p < 0,01$ ) y de la edad ( $p < 0,001$ ) así como una interacción significativa entre factores ( $p < 0,05$ ), de forma que las hembras mostraron una tasa de crecimiento mayor que los machos, especialmente a la edad de 15 y 19 días (Figura 26).

#### *Pesos a la edad de 20 y 25 días.*

Se analizaron los pesos de los animales registrados a los 20 y 25 días de edad, mediante Anova de dos vías con los factores sexo y tratamiento neonatal. Se realizaron Anovas en los que se analizó el efecto del tratamiento con naltrindol incluyendo en este caso los grupos SS-NTI en el factor tratamiento neonatal, y el efecto de la manipulación, incluyendo en el análisis los grupos SS-NM.

Los Anovas realizados para ver el efecto del tratamiento con naltrindol revelan que este tratamiento no modificó significativamente los pesos corporales a ninguna edad. A la edad de 20 días se observó un efecto residual ( $p < 0,1$ ) del sexo que resultó significativo a los 25 días de edad ( $p < 0,05$ ), presentando las hembras pesos menores que los machos en ambas edades (Tabla 11).

Los Anovas realizados para observar los efectos de la manipulación no revelaron efectos significativos de dicha manipulación sobre el peso de los animales a ninguna edad. Sin embargo se observó una interacción residual entre factores (sexo, tratamiento neonatal) a los 20 días ( $p < 0,1$ ) que resultó significativa a la edad de 25 días ( $p < 0,05$ ). El análisis *post-hoc* mostró un mayor peso de las hembras frente a los machos en los animales no manipulados, mientras que esta diferencia no se observó en los animales tratados neonatalmente con suero salino (Tabla 11).

#### *Evolución ponderal en el período postdestete (día 30-80).*

Con el objetivo de estudiar los posibles efectos del tratamiento neonatal con naltrindol, sobre la evolución de los pesos corporales y la tasa de crecimiento de los

animales hasta la edad adulta, se realizaron Anovas de dos vías para medidas repetidas con los factores tratamiento neonatal (suero salino, naltrindol) y edad (día 30, 40, 50, 60, 70, 80), para los pesos corporales absolutos y la tasa de crecimiento de los animales que, en este estudio, recordamos son machos únicamente. Para ambos parámetros, el análisis reveló un efecto significativo de la edad ( $p < 0,001$ ) mostrando el *post-hoc* diferencias entre todas las edades. El tratamiento neonatal con naltrindol no modificó significativamente la evolución de los pesos corporales absolutos (Tabla 12). El tratamiento con naltrindol tampoco afectó significativamente la tasa de crecimiento de los animales, sin embargo a partir del día 50 de edad, los animales tratados con naltrindol presentaron tasas de crecimiento ligeramente superiores a los controles (Figura 27).

*Tasa de crecimiento durante el tratamiento crónico con naltrindol (8 días) en edad adulta.*

El Anova de dos vías para medidas repetidas que tuvo como factores el tratamiento crónico (suero salino o naltrindol) y tiempo (desde el 2º hasta el 8º día de tratamiento) fue realizado con la tasa de crecimiento. En este caso hay que señalar que en este estudio no disponíamos de los pesos de los animales el día de nacimiento, de forma que hemos calculado la tasa de crecimiento con respecto al primer día de tratamiento. El análisis reveló un efecto significativo del factor tiempo ( $p < 0,001$ ), de forma que la tasa de crecimiento se incrementó ligeramente con el tiempo. El tratamiento crónico con naltrindol no tuvo un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento de los animales durante el período de tratamiento (Tabla 13).

**EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL DURANTE EL  
TRATAMIENTO NEONATAL (DÍA 0-19) CON NALTRINDOL.**

SEXO / TRATAMIENTO NEONATAL				
Día	MACHOS / SS	MACHOS / NTI	HEMBRAS / SS	HEMBRAS / NTI
0	<b>6,6 ± 0,1</b>	<b>6,6 ± 0,1</b>	<b>6,2 ± 0,1</b>	<b>6,0 ± 0,1</b>
1	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,5 ± 0,1
2	8,1 ± 0,1	8,0 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,4 ± 0,1
3	9,4 ± 0,2	9,3 ± 0,2	8,8 ± 0,1	8,6 ± 0,1
4	10,7 ± 0,2	10,6 ± 0,2	10,0 ± 0,2	9,8 ± 0,2
<b>5</b>	<b>12,0 ± 0,2</b>	<b>12,0 ± 0,2</b>	<b>11,5 ± 0,2</b>	<b>11,2 ± 0,2</b>
6	13,4 ± 0,2	13,6 ± 0,2	12,9 ± 0,2	12,6 ± 0,2
7	15,2 ± 0,3	15,3 ± 0,2	14,5 ± 0,2	14,3 ± 0,2
8	17,0 ± 0,3	17,0 ± 0,3	16,3 ± 0,2	15,9 ± 0,2
9	18,8 ± 0,3	18,8 ± 0,3	18,2 ± 0,2	17,7 ± 0,3
<b>10</b>	<b>20,8 ± 0,3</b>	<b>20,8 ± 0,3</b>	<b>20,2 ± 0,3</b>	<b>19,6 ± 0,3</b>
11	22,9 ± 0,3	22,8 ± 0,3	22,1 ± 0,3	21,5 ± 0,3
12	24,8 ± 0,3	24,6 ± 0,4	24,0 ± 0,3	23,4 ± 0,3
13	26,9 ± 0,3	26,9 ± 0,3	26,0 ± 0,3	25,6 ± 0,4
14	28,9 ± 0,3	29,0 ± 0,4	28,0 ± 0,3	27,4 ± 0,3
<b>15</b>	<b>30,9 ± 0,3</b>	<b>30,9 ± 0,4</b>	<b>29,9 ± 0,3</b>	<b>29,3 ± 0,4</b>
16	32,5 ± 0,3	32,5 ± 0,4	31,5 ± 0,3	30,9 ± 0,4
17	34,2 ± 0,4	34,3 ± 0,4	33,3 ± 0,4	32,6 ± 0,4
18	36,3 ± 0,4	36,3 ± 0,4	35,6 ± 0,4	34,8 ± 0,4
<b>19</b>	<b>39,0 ± 0,5</b>	<b>38,8 ± 0,5</b>	<b>38,1 ± 0,5</b>	<b>37,5 ± 0,5</b>

Tabla 10. Los valores representan el peso corporal (g) (media ± e.e.m. de 56-60 animales). En negrita se señalan las edades elegidas para realizar el análisis estadístico.

## EVOLUCIÓN DE PESOS CORPORALES DURANTE EL TRATAMIENTO NEONATAL CON NALTRINDOL (DÍAS 0-19).

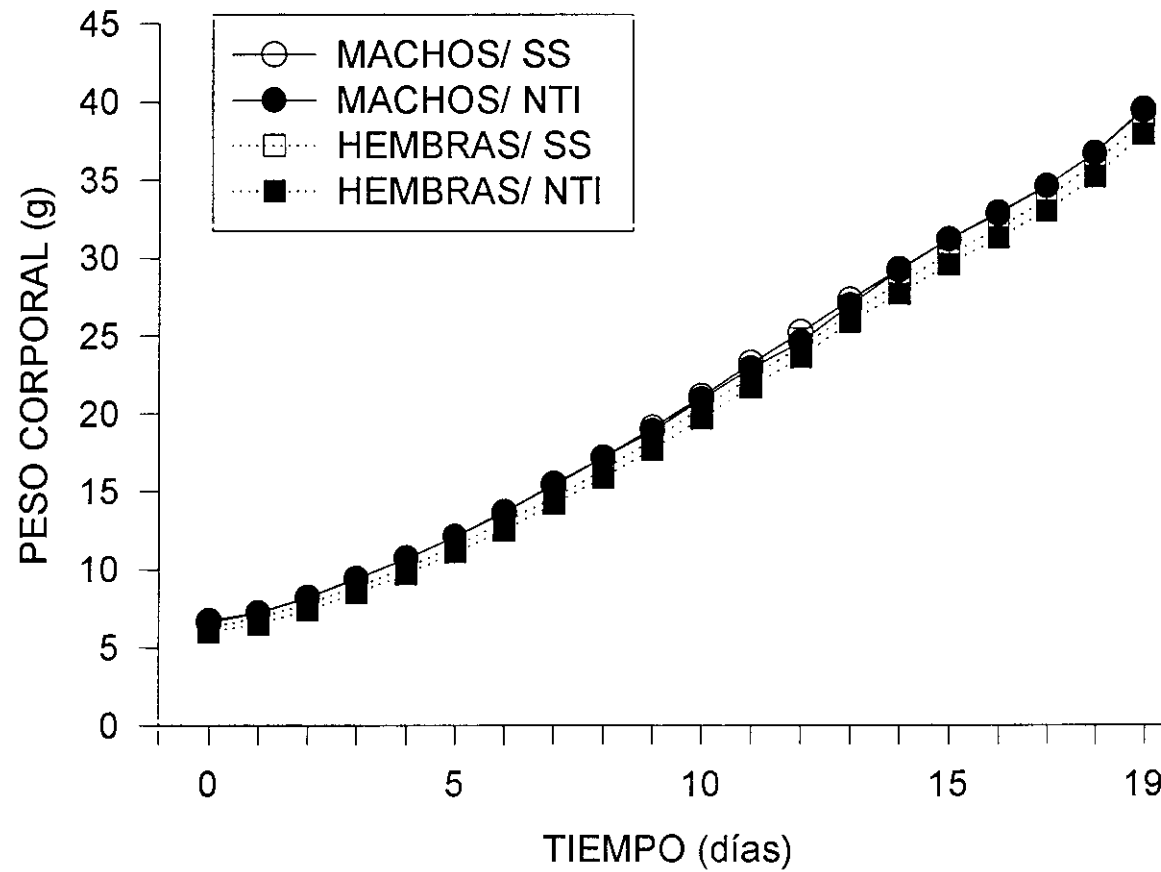


Figura 25. La gráfica representa la media  $\pm$  e.e.m. de 39-40 animales.

## EVOLUCIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO (DÍA 0-19)

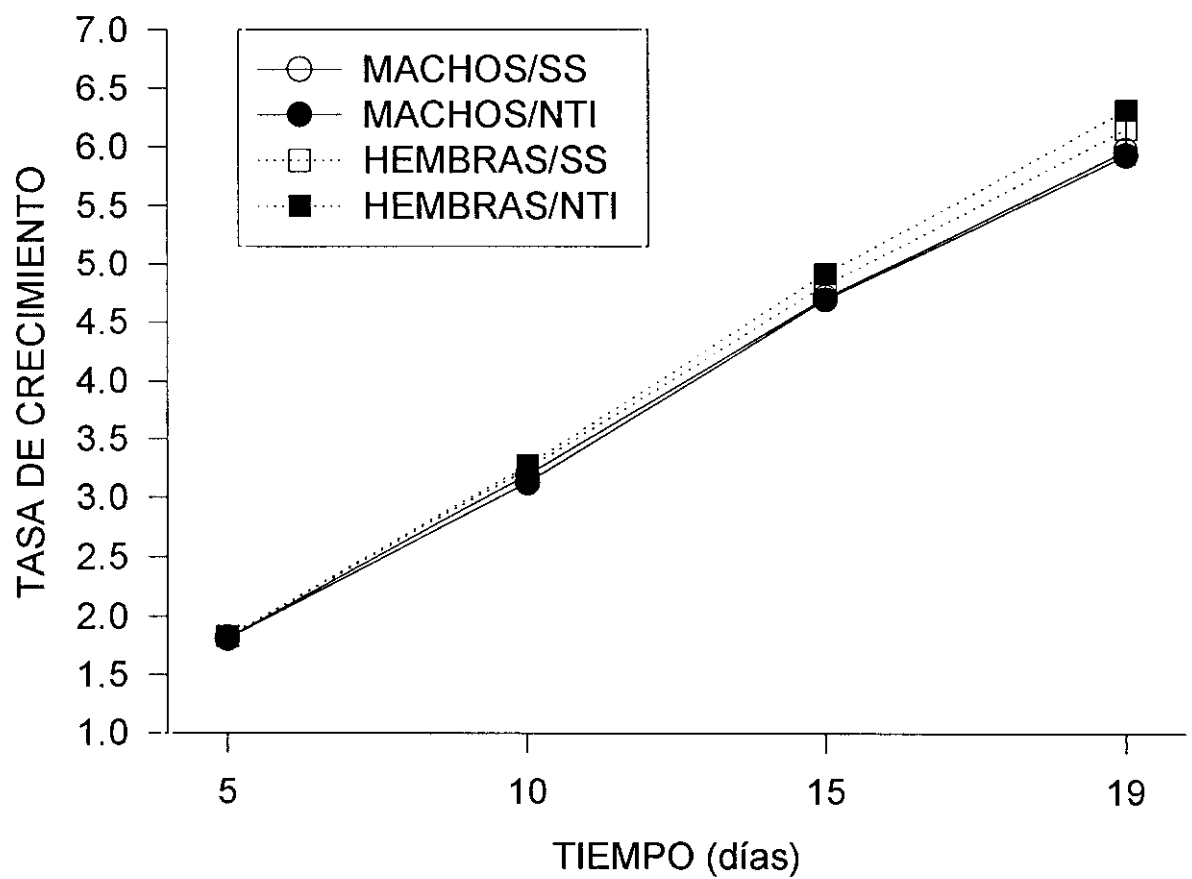


Figura 26. La gráfica representa la media  $\pm$  e.e.m. de 39-40 individuos.

## PESOS CORPORALES

<i>TRATAMIENTO NEONATAL</i>	20 DÍAS		25 DÍAS	
	<i>SEXO</i>			
	<i>MACHOS</i>	<i>HEMBRAS</i>	<i>MACHOS</i>	<i>HEMBRAS</i>
<b>NM</b>	$40,3 \pm 1,2$	$42,0 \pm 0,8$	$62,6 \pm 1,4$	$66,9 \pm 1,8^*$
<b>SS</b>	$43,0 \pm 0,7$	$41,5 \pm 0,8$	$65,7 \pm 1,4$	$63,9 \pm 1,2$
<b>NTI</b>	$42,3 \pm 0,6$	$40,9 \pm 1,0$	$66,1 \pm 1,4$	$60,9 \pm 1,8^*$

Tabla 11. Los valores corresponden a la media  $\pm$  e.e.m de los pesos corporales (g) de 18-30 animales.

\*  $p < 0,05$  frente a los machos de la misma edad y del mismo tratamiento neonatal.

## EVOLUCIÓN DE PESOS CORPORALES

PERIODO POSTDESTETE-EDAD ADULTA

DÍAS 30-80

TRATAMIENTO NEONATAL	EDAD (días)					
	30	40	50	60	70	80
SS	109,4 ± 4,6	207,4 ± 5,5	296,7 ± 7,9	379,1 ± 9,0	444,3 ± 9,9	497,0 ± 10,1
NTI	105,4 ± 4,1	204,6 ± 4,8	299,9 ± 6,5	378,5 ± 7,6	443,3 ± 8,5	489,1 ± 10,0

Tabla 12. Los valores corresponden a la media ± e.e.m del peso corporal (g) de 16-18 animales.

## EVOLUCIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO PERÍODO POSTDESTETE (DÍAS 30-80)

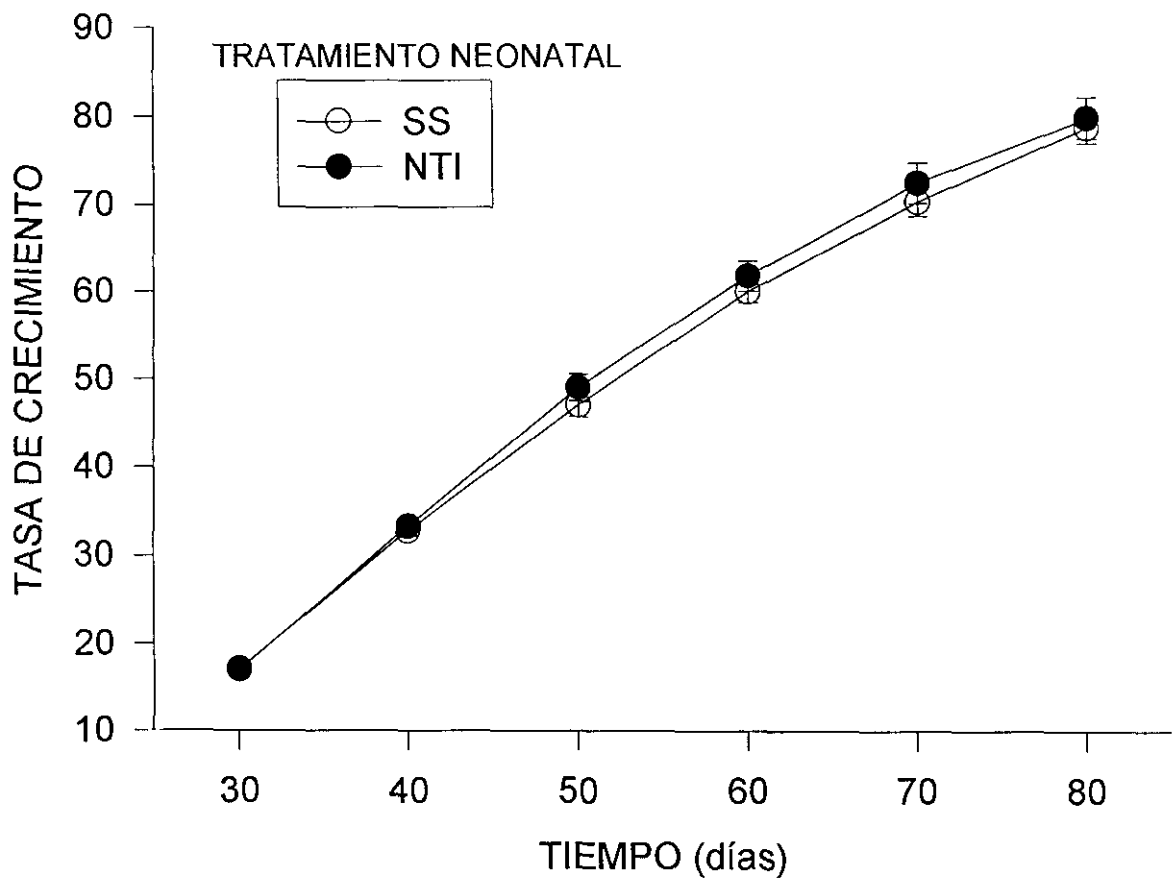


Figura 27. La gráfica representa la media  $\pm$  e.e.m. de 16-18 individuos

## EVOLUCIÓN DE TASA DE CRECIMIENTO

TRATAMIENTO CRÓNICO CON NALTRINDOL (8 DÍAS)  
EDAD ADULTA

	DÍA DE TRATAMIENTO CRÓNICO						
	2	3	4	5	6	7	8
SS	1,01± 0,01	1,03 ± 0,01	1,04 ± 0,02	1,04 ± 0,01	1,05 ± 0,02	1,06 ± 0,02	1,06 ± 0,02
NTI	1,01± 0,01	1,03 ± 0,01	1,03 ± 0,02	1,04 ± 0,02	1,05 ± 0,02	1,06 ± 0,02	1,06± 0,03

Tabla 13. Los valores corresponden a la media ± e.e.m de la tasa de crecimiento de 29-30 animales.

## DISCUSIÓN

Diversos trabajos han llevado a sugerir que los péptidos opioides podrían jugar un papel en el crecimiento por medio de mecanismos inhibitorios y que esta regulación podría tener lugar a través de un *input* tónico (Zagon y McLaughlin 1992). Sin embargo, algunos de los resultados que han llevado a esta interpretación (Zagon y McLaughlin 1984) no han sido replicados por otros autores (Petrie 1993). Discrepancias de este tipo sugieren que quizá diversos factores, como la estirpe de ratas estudiadas, efectos de tipo nutricional, la influencia de los ritmos circadianos y otras variables que afecten a la metodología, pueden contribuir a explicar las diferencias entre los resultados encontrados en los distintos laboratorios (De Cabo y Viveros 1997). En todo caso, el papel que el SOE pueda jugar en el crecimiento postnatal es una cuestión debatida.

Los presentes resultados indican que el tratamiento crónico con naltrindol durante el período neonatal (inyecciones diarias de 1mg/kg durante el período predestete) no produjo efectos significativos sobre el peso corporal ni sobre la tasa de crecimiento de los animales durante el período de tratamiento. Pese a que en ningún caso las diferencias fueron significativas, observamos que las hembras tratadas neonatalmente con naltrindol mostraron, a lo largo del período de tratamiento neonatal (días 0-19), una tendencia leve pero mantenida a un menor peso corporal con respecto a las inyectadas neonatalmente con suero salino, así como una tasa de crecimiento ligeramente incrementada. En estudios anteriores hemos encontrado que un tratamiento similar consistente en inyecciones diarias de naltrexona (1mg/kg) durante el período predestete disminuyó significativamente la tasa de crecimiento de animales de ambos sexos durante el período de tratamiento, aunque las diferencias fueron pequeñas en términos absolutos (De Cabo y Viveros 1997).

Nuestros datos indican que el tratamiento crónico con naltrindol durante el período predestete, no modificó significativamente los pesos corporales ni la tasa de crecimiento de los animales durante el período postdestete-edad adulta. Pese a que en ningún caso las

diferencias fueron estadísticamente significativas, observamos que los animales (en este estudio sólo se utilizaron machos) tratados neonatalmente con naltrindol presentaron tasas de crecimiento ligeramente mayores a partir del día 50 de edad. El tratamiento crónico con naltrindol en edad adulta (inyecciones diarias de 1mg/kg durante 8 días) tampoco afectó significativamente la tasa de crecimiento de los animales durante el tratamiento. En estudios previos se ha encontrado que la administración de naltrexona durante el periodo predestete incrementó significativamente los pesos corporales de animales de ambos sexos durante el periodo postdestete (De Cabo y Viveros 1997).

Un efecto sobre el peso de los animales podría deberse directamente al bloqueo funcional del receptor opioide o alternativamente, a efectos sobre el comportamiento de mamar. Así, se ha observado que la administración de naloxona a la dosis de 1 mg/kg evita, durante su tiempo de acción, el reflejo de mamar en crías de rata (Sewell 1980). Por otro lado se ha visto que la administración del antagonista  $\mu$  CTOP disminuye o incrementa la respuesta a un pezón artificial dependiendo del lugar de inyección (Petrov y col. 1998) mientras que los agonistas  $\mu$  opioides incrementan dicha respuesta (Robinson y col. 1995). Dado que la naltrexona es un antagonista opioide general, que a la dosis empleada en el trabajo citado anteriormente presenta una mayor afinidad por el receptor  $\mu$ , el hecho de que en el presente estudio el tratamiento neonatal con naltrindol no haya tenido efectos significativos sobre el peso o la tasa de crecimiento de los individuos parece indicar que es el receptor  $\mu$  más que el  $\delta$  el que está implicado en el crecimiento somático de los animales. Algunos estudios encuentran que el naltrindol redujo la ingesta de sacarina (Beczowska y col. 1993, Krishnan-Sarin y col. 1995) y el tratamiento crónico disminuyó la ganancia de peso en ratas con una dieta altamente sabrosa (Cole y col. 1995). Por otro lado Kelley y sus colaboradores (1996) han encontrado que la administración de naltrindol en el núcleo accumbens aumenta la ingesta en ratas. Sin embargo, en distintos estudios se ha encontrado que la administración de antagonistas  $\delta$  no modificó la ingesta de los animales

(Arjune y col. 1991, Beczkowska y col. 1992, Bodnar y Geary 1991, Papadouka y Carr 1994). Otros datos sugieren que en ratas predestete serían los receptores  $\mu$  y  $\kappa$ , pero no los  $\delta$ , los implicados en la regulación de los comportamientos de ingesta (Jackson y Sewell 1984), lo que podría tener relación con el desarrollo retrasado del receptor  $\delta$  en relación con los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  (Kitchen y col. 1995b, Kornblum y col. 1987, McDowell y Kitchen 1986, 1987). Estos últimos datos podrían contribuir a explicar que, en nuestro caso, el tratamiento con naltrindol haya tenido un escaso efecto sobre el peso de los animales.

En lo relativo a las diferencias sexuales encontramos que, durante el período predestete, de acuerdo con estudios previos (De Cabo y Viveros 1997), las hembras presentaron tasas de crecimiento superiores así como un menor peso corporal. Estas diferencias, aunque se vieron en ambos grupos de tratamiento neonatal, únicamente resultaron significativas en animales tratados con naltrindol, posiblemente debido a que parece que es en las hembras donde más se manifiesta la sutil influencia del naltrindol sobre el peso.

De nuestros resultados se deduce que la manipulación de los animales no indujo modificaciones marcadas en el peso corporal de animales neonatales. Algunos estudios encuentran que animales que fueron manipulados durante las tres primeras semanas postnatales (separación de la madre durante 3 horas diarias) presentaron pesos significativamente disminuidos el día 22 de edad (Mcintosh y col. 1999). Nuestra manipulación consistió en recoger las crías para pesarlas e inyectarlas, y el tiempo que pudieron estar aisladas de la madre no excedió los 5 minutos, por lo tanto resulta menos estresante para las crías. De acuerdo con nuestro resultado, se ha encontrado que un aislamiento de 15 minutos diarios durante las tres primeras semanas de vida no modificó significativamente el peso de los animales el día 22 de edad (Mcintosh y col. 1999). Tan sólo observamos que al día 25 el peso de las hembras no manipuladas fue mayor que el de los correspondientes machos, mientras que en los animales manipulados tratados con suero

salino durante el periodo predestete no se observó dicho efecto. Más aún en los animales tratados con naltrindol fueron los machos los que presentaron un mayor peso corporal que las correspondientes hembras. Estos resultados indican que el procedimiento de manipulación y el tratamiento con naltrindol, en conjunto, invirtieron el sentido de las diferencias sexuales en animales postdestete.

Los efectos de tratamientos neonatales con antagonistas opioides sobre la evolución ponderal, podrían interpretarse, como ya se ha indicado, como un efecto directo sobre el crecimiento de los animales o como consecuencia de un efecto sobre la ingesta. Existe también la posibilidad de que el control por parte de los opioides endógenos de fenómenos ligados al desarrollo somático, pueda producirse mediante efectos indirectos sobre sistemas hormonales. En este sentido, algunos resultados sugieren que tanto los receptores  $\mu$  como los  $\kappa$  están implicados en la regulación de la secreción de la hormona del crecimiento en ratas neonatales, mientras que los receptores  $\delta$  no parecen jugar una función importante de forma independiente en esta respuesta, pero podrían actuar de forma sinérgica con los receptores  $\mu$  en la inducción de la estimulación (Eason y col. 1996). Desde esta perspectiva resulta coherente que, en nuestro estudio, el bloqueo selectivo del receptor  $\delta$  haya producido modificaciones muy sutiles sobre la evolución ponderal de los animales, que sólo se han detectado indirectamente o como tendencias, pero en ningún caso como efectos significativos del tratamiento con naltrindol "*per se*".

La ausencia de efectos significativos de los tratamientos con naltrindol sobre el peso corporal de los animales indica que las modificaciones observadas en cuanto a respuestas analgésicas y comportamentales y otras variables estudiadas inducidas por dichos tratamientos se deben a efectos específicos sobre estos parámetros y no son consecuencia indirecta de ningún efecto importante del antagonista  $\delta$  sobre el estado nutricional o el crecimiento somático de los animales.

## **VI. CONCLUSIONES**

Se exponen a continuación las principales conclusiones que se derivan de los resultados obtenidos en las condiciones experimentales que se describen en esta Tesis Doctoral:

1.- Los tratamientos crónicos con naltrindol utilizados no modificaron los umbrales nociceptivos de los animales ni en la prueba de inmersión de la cola (neonatos) ni en el test de estimulación eléctrica de la cola (adultos). Estos resultados indican que el receptor  $\delta$ -opioide no está implicado en el establecimiento de la sensibilidad al dolor inducido por estímulo térmico o eléctrico. En el periodo neonatal, las hembras presentaron mayor sensibilidad que los machos al estímulo térmico nociceptivo y la manipulación incrementó la sensibilidad a dicho estímulo en ambos sexos.

2.- El bloqueo funcional del receptor  $\delta$ -opioide durante el período predestete, mediante un tratamiento crónico con naltrindol, bloqueó la respuesta antinociceptiva a alfentanil pero no afectó significativamente la antinocicepción inducida por CI-977 en ratas macho de 20 días de edad, lo que indica una interacción funcional  $\delta$ - $\mu$ , pero no  $\delta$ - $\kappa$  en la modulación de la antinocicepción durante el período neonatal.

3.- Los efectos del alfentanil (exploración aumentada) y del CI-977 (una marcada hipoactividad) en el campo abierto, no fueron modificados por el tratamiento neonatal con naltrindol. Estos resultados indican ausencia de interacción  $\delta$ - $\mu$  o  $\delta$ - $\kappa$  en la mediación de respuestas comportamentales en ratas neonatales.

4.- Lo expuesto en las dos anteriores conclusiones sugiere que los sistemas  $\mu$  y  $\delta$  implicados en la modulación de la antinocicepción son, al menos en parte, distintos de aquellos implicados en las respuestas comportamentales en el campo abierto.

5.- El bloqueo funcional del receptor  $\delta$ -opioide durante el período predestete no tuvo efecto sobre la respuesta antinociceptiva a morfina en machos de 20 días de edad, mientras que la manipulación redujo el efecto de la morfina en estos animales. Por el contrario, en hembras de la misma edad el tratamiento neonatal con naltrindol pareció potenciar el efecto de la manipulación, mostrando las hembras tratadas con naltrindol una antinocicepción por morfina incrementada con respecto a las no manipuladas.

6.- Tomados en conjunto, los resultados de nuestros estudios con alfentanil y morfina indican que los efectos del bloqueo funcional del receptor  $\delta$ -opioide durante el período predestete sobre las respuestas antinociceptivas mediadas por el receptor  $\mu$ , dependen del agonista  $\mu$  utilizado y del sexo de los animales. Asimismo, se han detectado diferencias sexuales en cuanto a los efectos de la manipulación sobre la antinocicepción mediada por receptor  $\mu$ .

7.- El bloqueo funcional del receptor  $\delta$ -opioide durante el período predestete no tuvo efecto ni sobre los niveles basales de corticosterona ni sobre la respuesta de corticosterona al estrés en ratas macho de 25 días de edad, mientras que la manipulación evitó la elevación de corticosterona en respuesta al estrés sólo en machos y redujo los niveles basales sólo en hembras. Tomados en conjunto, estos datos junto con los encontrados anteriormente en hembras de la misma edad, sugieren un dimorfismo sexual en cuanto a la implicación del receptor  $\delta$  y los efectos de la manipulación en la respuesta adrenocortical al estrés.

8.- La morfina, a las dosis utilizadas en este trabajo, afectó significativamente a la respuesta de vocalización (mediada a nivel supraespinal) pero no a la respuesta motora (mediada a nivel espinal) de machos adultos, en la prueba de estimulación eléctrica de la cola y el tratamiento crónico con naltrindol no modificó el efecto inhibitorio de la morfina sobre la

vocalización. Estos resultados indican que la respuesta de vocalización, que refleja el componente afectivo del dolor, está específicamente mediada por el receptor  $\mu$ , sin una contribución aparente del receptor  $\delta$ .

9.- La administración aguda de naltrindol indujo una marcada hipoactividad en ratas macho de 20 días de edad, mientras que la administración crónica del antagonista produjo el efecto opuesto (hiperactividad), así como una alteración en la tasa de recambio de dopamina en la sustancia nigra. Estos datos indican que el receptor  $\delta$ , probablemente en interacción con el sistema dopaminérgico, está implicado en la modulación tónica de la actividad motora durante el período neonatal.

10.- En contraste con lo observado en neonatos, el tratamiento crónico con naltrindol en machos adultos sólo indujo modestas alteraciones en la actividad de los animales y el tratamiento neonatal con el antagonista  $\delta$  no tuvo efectos significativos a largo plazo sobre el comportamiento en tablero de agujeros o laberinto en cruz. De acuerdo con los resultados obtenidos en ratas jóvenes, ninguno de los dos tratamientos citados modificó la reactividad corticoadrenal de los adultos. Los resultados indican una mayor vulnerabilidad de las ratas neonatales en cuanto a los efectos del naltrindol sobre el comportamiento y refuerzan la idea de que el receptor  $\delta$  no está implicado en la modulación de la actividad adrenocortical en ratas macho.

11.- El tratamiento neonatal con naltrindol afectó significativamente al cociente DOPAC/DA en sustancia nigra de machos de 20 días (lo que podría relacionarse con los efectos del tratamiento sobre la actividad de estos animales) y al contenido de NA en el caudado putamen de hembras neonatales. Se encontraron además tanto diferencias sexuales como diferencias entre 20 y 25 días que afectaron sobre todo al sistema dopaminérgico.

12.- Los tratamientos con nalfrindol utilizados en este trabajo no modificaron significativamente la evolución ponderal de los animales, lo que indica que las alteraciones inducidas por dichos tratamientos sobre las respuestas antinociceptivas y comportamentales se deben a efectos específicos sobre dichas respuestas y no son consecuencia indirecta de ningún efecto importante del antagonista  $\delta$  sobre el crecimiento somático de los animales o su estado nutricional.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- 
- Abbott F.V., Guy E.R. (1995). Effects of morphine, pentobarbital and amphetamine on formalin-induced behaviours in infant rats: sedation vs specific suppression of pain. *Pain* 62: 303-312.
  - Adams P.M., Beauchamp R., Alston C. (1981). Potentiation of apomorphine and d-amphetamine effects by naloxone. *Life Sci.* 28: 629-634.
  - Adams J.U., Tallarida R.J., Geller E.B., Adler M.W. (1993). Isobolographic superadditivity between delta and mu opioid agonists in the rat depends on the ratio of compounds, the mu agonist and the analgesic assay use. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 1261-1267.
  - Adamson W.T., Windh R.T., Blackford S., Kuhn C.M. (1991). Ontogeny of mu- and kapa-opiate receptor control of the hypothalamo-pituitary axis in rats. *Endocrinology* 129(2): 959-964
  - Adler M.W. (1980). Minireview ; Opioid peptides. *Life Sci.* 26: 497-510.
  - Adler M.W., Geller E.B. (1988). The opioid system and temperature regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28: 429-449.
  - Aguiar C.E., Cadore I.P., Padoin M.J., Barbosa-Coutinho L.M., Lucion A.B. (1997). Aversive stimulation during the stress-hyporesponsive period does not affect the number of corticotroph cells in neonatal male rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30 (12): 1463-66.
  - Ahlers I., Smajda B., Anlersova E. (1980). Circadian rhythm of plasma and adrenal corticosterone in rats: effect of restricted feeding schedules. *Endocrinol. Exp.* 14: 183-190.
  - Ajayi A.A., Ukponmwan O.E. (1994). Possible evidence of angiotensin II and endogenous opioid modulation of novelty-induced rearing in the rat. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 23(3): 287-290.
  - Akil H., Watson S.J., Young E., Lewis M.E., Khachaturian H., Walker J.M. (1984). Endogenous opioids, biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 7: 223-255.
  - Alberti I., Fernández B., Alguacil L.F., Aguilar A., Caamaño M., Romero E.M., Viveros M.P. (1999). Prewearling naltrindole administration differentially affects clonidine induced antinociception and plasma adrenaline levels in male and female neonatal rats. *Br. J. Pharmacol.* En prensa.
  - Alberti I. (1999). Efectos de la administración crónica de naltrindol sobre la antinocicepción y los cambios en niveles plasmáticos de adrenalina inducidos por clonidina en ratas neonatales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología U.C.M.
  - Albonetti M.E., Farabollini F. (1992). Behavioral responses to single and repeated restraint in male and female rats. *Behav. Proc.* 28: 97-110.
  - Allen C., Kendall J.W. (1967). Maturation of the circadian rhythm of plasma corticosterone in the rat. *Endocrinology* 80: 926-930.
  - Ali B.H., Sharif S.I., Elkadi A. (1995). Sex differences and the effect of gonadectomy on morphine-induced antinociception and dependence in rats and mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22 (5): 342-344.
  - Aloisi A.M., Steenbergen H.L., Van de Poll N.E., Farabollini F. (1994). Sex-dependent effects of restraint on nociception and pituitary-adrenal hormones in the rat. *Physiol. Behav.* 5 (5):789-793.
  - Aloisi A.M., Ceccarelli I., Lupo C. (1998). Behavioural and hormonal effects of restraint stress and formalin test in male and female rats. *Brain Res. Bull.* 47(1): 57-62.
  - Andrews J.S., Holtzman S.G. (1987). Effects of naloxone and diprenorphine on amphetamine-stimulated behavior in guinea-pigs and rats. *Neuropharmacology* 26:1115-1120.

- 
- Antelo M.T., Fernández B., Kitchen I., Viveros M.P. (1998). Effects of preweaning chronic naltrindole administration on stress-induced antinociceptive responses in rats. *Dev. Brain. Res.* 110: 127-130.
  - Antelo M.T. (1998). Efectos de la administración crónica de naltrindol sobre el desarrollo de respuestas antinociceptivas en ratas hembras. Correlaciones neuroendocrinas. Tesis de licenciatura. Facultad de CC. Biológicas. U.C.M.
  - Ardeleanu A., Sterescu N. (1978). RNA and DNA synthesis in developing rat brain: hormonal influences. *Psychoneuroendocrinology* 3: 93-101.
  - Arjune D., Bowen W.D., Bodnar R.J. (1991). Ingestive behavior following central [D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Cys<sup>6</sup>]-enkephalin (DALCE), a short-acting agonist and long-acting antagonist at the delta opioid receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39(2): 429-436.
  - Arnold P., Gorski R.A. (1984). Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annual Reviews in Neuroscience* 7: 413-442.
  - Arnsten A.T., Segal D.S. (1979). Naloxone alters locomotion and interaction with environmental stimuli. *Life sci.* 25: 1035-1042.
  - Arvidsson U., Dado R.J., Riedl M., Lee J.H., Law P.Y., Loh H.H., Elde R., Wessendorf M.W. (1995). Delta-opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. *J. Neurosci.* 15:1215-1235.
  - Baamonde A., Daugé V., Ruiz-Gayo M., Fulga I.G., Turcaud S., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P. (1992). Antidepressant-type effects of endogenous enkephalins protected by systemic RB 101 are mediated by opioid delta and dopamine D1 receptor stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* 216: 157-166.
  - Bailey C., Kitchen I. (1987). Developmental responses to opioids reveals a lack of effect on stress-induced corticosterone levels in neonatal rats. *Br. J. Pharmacol.* 91: 119-125.
  - Bakshi V.P., Kelley A.E. (1993). Feeding induced by opioid stimulation of the ventral striatum: role of opiate receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 1253-1260.
  - Balcells-Olivero M., Vezina P. (1996). Naltrexone attenuates acute amphetamine-induced rearing and blocks its sensitization by repeated amphetamine. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22: 78.
  - Balazs R., Cotterrell M. (1972). Effect of hormonal state on cell number and functional maturation of the brain. *Nature (London)* 236: 348-350.
  - Bardo M.T., Bhatnagar R.K., Gebhart G.F. (1981). Opiate receptor ontogeny and morphine induced effects: influence of chronic footshock stress in preweanling rats. *Dev. Brain. Res.* 1: 487-495.
  - Bardo M.T., Bhatnagar R.K., Gebhart G.F. (1982). Differential effects of chronic morphine and naloxone on opiate receptors, monoamines, and morphine-induced behaviors in preweanling rats. *Dev. Brain Res.* 4: 139-147.
  - Bardo M.T., Bhatnagar R.K., Gebhart G.F. (1983a). Chronic naltrexone increases opiate binding in brain and produces supersensitivity to morphine in the locus coeruleus in the rat. *Brain Res.* 289: 223-234.
  - Bardo M.T., Bhatnagar R.K., Gebhart G.F. (1983b). Age-related differences in the effect of chronic administration of naloxone on opiate binding in rat brain. *Neuropharmacology* 22: 453-461.
  - Bardo M.T., Miller J.S., Risner M.E. (1984). Opiate receptor supersensitivity produced by chronic naloxone treatment: Dissociation of morphine-induced antinociception and conditioned taste aversion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 21: 591-597.

- 
- Bardo M.T., Neisewander J.L., Pierce R.C. (1989). Novelty-induced place preference behavior in rats: effects of opiate and dopaminergic drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32: 683-689.
  - Barnett S.A. (1963). *The rat: A study in behavior*. London: Methuen.
  - Baron S.A., Testa F.M., Gintzler A.R. (1985). Simultaneous quantitation of norepinephrine, dopamine and serotonin in brain during and following chronic naltrexone administration. *Brain Res.* 340: 192-198.
  - Bayon A., Shoemaker W.J., Bloom F.E., Mauss A., Guillemin R. (1979). Perinatal development of the endorphin- and enkephalin- containing systems in the rat brain. *Brain Res.* 179: 93-101.
  - Beatty W.W. (1979). Gonadal hormones and sex differences in non-reproductive behaviors in rodents: organizational and activational influences. *Horm. Behav.* 12:112-163.
  - Beczkowska I.W., Bowen W.D., Bodnar R.J. (1992). Central opioid receptor subtype antagonists differentially alter sucrose and deprivation-induced water intake in rats. *Brain Res.* 589: 291-301.
  - Beczkowska I.W., Koch J.E., Bostock M.E., Leibowitz S.F., Bodnar R.J. (1993). Central opioid receptor subtype antagonists differentially reduce intake of saccharin and maltose dextrin solutions in rats. *Brain Res.* 618: 261-270.
  - Befort D., Kieffer B.L. (1997). *Pain Rev.* 4: 199.
  - Besse D., Lombard M.C., Zajac J.M., Roques B.P., Besson J.M. (1990). Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res.* 521: 15-22.
  - Betancur C., Azzi M., Rosténe W. (1997). Nonpeptide antagonists of neuropeptide receptors: tools for research and therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 372-386
  - Biagini G., Zoli M., Merlo Pich E., Marrama P., Agnati L.F. (1991). Different stressful neonatal treatments modulate glucocorticoid receptor immunoreactivity in the hippocampal CA1 region and affect exploratory behavior in the adult rat. En *Stress and related disorders: From adaptation to dysfunction* (Editado por Genazzani A.R., Nappi G., Petraglia F., and Martignoni E.), pp 139-149. The Parthenon Publishing Group, New Jersey.
  - Birch P.J., Hayes A.G., Sheehan M.J., Tyers M.B. (1987). Nor-binaltorphimine: antagonistic profile at  $\kappa$  opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 144: 405-408.
  - Birnbaumer L., Abramowitz J., Brown A.M. (1990). Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1031: 163-224.
  - Blizzard D., Lippman H.R., Chen J.J. (1975). Sex differences in open field behavior in the rat: The inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiol. Behav.* 14: 601-608.
  - Bloom F.E., Schulman J.A., Koob G.F. (1988). Catecholamines and behavior. En *Handbook of Experimental Pharmacology* (Editado por Trendelenburg W., Weiner N.), Vol. 90/II, pp. 27-88. Springer-Verlag, New York.
  - Bodnar R.J., Romero M.T., Kramer E. (1988). Organismic variables and pain inhibition: roles of gender and aging. *Brain Res. Bull.* 21: 947-953.
  - Bodnar R.J., Geary N. (1991). Roles of opioid receptor subtypes in rats' feeding behavior. *Appetite* 17:239.
  - Bohn M.C. (1980). Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. *Neuroscience* 5: 2003-2012.

- 
- Bohn M.C., Lauder J.M. (1978). The effects of hydrocortisone on rat cerebellar development. *Dev. Neurosci.* 1: 250-266.
  - Borszcz G.S. (1995). Increases in vocalization and motor reflex thresholds are influenced by the site of morphine microinjection: comparisons following administration into the periaqueductal gray, ventral medulla, and spinal subarachnoid space. *Behav. Neurosci.* 109(3): 502-522.
  - Bot G., Chahl L.A., Brent P.J., Johnston P.A. (1992). Effects of intracerebroventricularly administered mu-, delta- and kappa-opioid agonists on locomotor activity of the guinea pig and the pharmacology of the locomotor response to U50,488. *Neuropharmacology* 31: 825-833.
  - Bourgoin S., Benoliel J.J., Collin E., Mauborgne A., Pohl M., Hamon M., Cesselin F. (1994). Opioidergic control of the spinal release of neuropeptides: possible significance for the analgesic effects of opioids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 8: 307-321.
  - Boyle S.J., Meecham K.G., Hunter J.C., Hughes J. (1990). [<sup>3</sup>H]-CI-977: a highly selective ligand for the κ-opioid receptor in both guinea-pig and rat forebrain. *Mol. Neuropharmacol.* 1: 23-29.
  - Brady L.S., Holtzman S.J. (1981). Effects of intraventricular morphine and enkephalins on locomotor activity in nondependent, morphine-dependent and postdependent rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218: 613-620.
  - Bradbury A.F., Smyth D.G., Snell C.R., Birdsall N.J.M., Hulme E.C. (1976). C-fragment of lipoprotein has a high affinity for brain opiate receptors. *Nature (Lond)* 260: 793-795.
  - Broccardo M., Improta G. (1992). Antidiarrheal and colonic antipropulsive effects of spinal and supraspinal administration of the natural δ opioid receptor agonist, [D-Ala<sup>2</sup>]-deltorphin II in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 218: 69-73.
  - Buckingham J.C. (1982). Secretion of corticotrophin and its hypothalamic releasing factor in response to morphine and opioid peptides. *Neuroendocrinology* 35: 111.
  - Buckingham J.C., Cooper T.A. (1984a). Differences in hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in the rat after acute and prolonged treatment with morphine. *Neuroendocrinology* 38:411.
  - Buckingham J.C., Cooper T.A. (1984b). Hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in the naloxone-treated rat. *J. Physiol.* 354, 76P.
  - Buckingham J.C., Cooper T.A. (1987). Modulation of the secretion of corticotropin-releasing factor (CRF) by opioid substances. *Br. J. Pharmacol.* 90: 167.
  - Bugajski J., Turoon M., Gadek-Michalska A., Olowska A. (1995). Influence of the central histaminergic systems on the pituitary-adrenocortical response to met-enkephalinamide. *J. Physiol. Pharmacol.* 46(3): 313-322.
  - Bunzow J.R., Grandy D.K., Kelly M. (1993). Cloning pharmacological characterization and distribution of a rat mu- opioid receptor: *Genbank Accession No.* U02083.
  - Burks T.F., Fox D.A., Hirling L.D., Shook J.E., Porreca F. (1988). Regulation of gastrointestinal function by multiple opioid receptors. *Life Sci.* 43: 2177-2181.
  - Buzas B., Izenwasser S., Portoghese P.S., Cox B.M. (1994). Evidence for delta opioid receptor subtypes regulating adenylyl cyclase activity in rat brain. *Life Sci.* 54. PL 101-106.
  - Calenco-Choukroun G., Dauge V., Gacel G., Féger J., Roques B.P. (1991). Opioid δ agonist and endogenous enkephalins induce different emotional reactivity than μ agonist after injection in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology* 103: 493-502.

- 
- Calcagnetti D.J., Fleetwood S.W., Holtzman S.G. (1990). Pharmacological profile of the potentiation of opioid analgesia by restraint stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37: 193-199.
  - Calcagnetti D.J., Reid L.D. (1983). Morphine and acceptability of putative reinforcers. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18: 567-569.
  - Campbell J., Spear L.P. (1999). Effects of early handling on amphetamine-induced locomotor activation and conditioned place preference in the adult rat. *Psychopharmacology* 143(2): 183-189.
  - Carrol M.N., Lim R.K.S. (1960). Observations on the neuropharmacology of morphine and morphine-like analgesia. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 125: 383-403.
  - Castellano C., Pavone F. (1987). Effects of the selective  $\kappa$ -opioid receptor agonist U50,488 on locomotor activity and passive avoidance behavior in DBA/2 and C57BL/6 mice. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 288: 270-280.
  - Castellano C., Puglisi-Allegra S. (1982). Effects of naloxone and naltrexone on locomotor activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16: 561-563.
  - Ceballos M.L., Fontenla J.A. (1999). A hyperkinetic syndrome following Met-Enkephalin antibody administration: relevance to Huntington's disease. *Dolor. Investigación, Clínica y Terapéutica.* vol. 14. sup. I. pag. 16.
  - Cha X.Y., Xu H., Rice K.C., Porreca F., Lai J., Ananthan S., Rothman R.B. (1995). Opioid peptide receptor studies: 1. Identification of a novel delta-opioid receptor binding site in rat brain membranes. *Peptides* 16(2): 191-198.
  - Chaillet R., Coulaud A., Zajac J.M., Fournié-Zaluski M.C., Costentin J., Roques B.P. (1984). The  $\mu$  rather than the  $\delta$  subtype of opioid receptors appear to be involved in enkephalin induced analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 101: 83-90.
  - Chang A.C., Takemori A.E., Ojala W.H., Gleason W.B., Portoghese P.S. (1994).  $\kappa$  opioid receptor selective affinity labels: electrophilic benzeneacetamides as  $\kappa$  selective opioid antagonists. *J. Med. Chem.* 37: 4490-4498.
  - Chavkin C., James I.F., Goldstein A. (1982). Dynorphin is a specific endogenous ligand of the  $\kappa$  opioid receptors. *Science* 215: 413-415.
  - Chen Y., Mestek A., Liu J., Hurley J.A., Yu L. (1993a). Molecular cloning and functional expression of a mu opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44: 8-12.
  - Chen Y., Mestek A., Liu J., Yu L. (1993b). Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem. J.* 295: 625-628.
  - Chesire R.M., Wang X., Fox R., Vogler J. (1995). Chronic morphine exaggerates the excessive forward locomotion produced by NRTP damage. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21: 730.
  - Churchill L., Roques B.P., Kalivas P.W. (1998). Dopamine depletion augments endogenous opioid-induced locomotion in the nucleus accumbens using both  $\mu$ 1 and delta opioid receptors. *J. Neurosci.* 18(19): 8074-8085.
  - Cicero T.J., Nock B., Meyer E.R. (1996). Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 767-773.
  - Cicero T.J., Nock B., Meyer E.R. (1997). Sex-related differences in morphine's antinociceptive activity: relationship to serum and brain morphine concentrations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 939-944.

- 
- Civelli O., Douglas J., Herbert E. (1984). Pro-opiomelanocortin: A polypeptide at the interface of the endocrine and nervous system. En *The Peptides* (Editado por Udenfriend S., Meienhofer S.), pp 70-90. Academic Press, London.
  - Clark C.R., Birchmore B., Sharif N.A., Hunter J.C., Hill R.G., Hughes J. (1988). PD 117302: a selective agonist for the  $\kappa$ -opioid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 93: 618-626.
  - Clark J.A., Liu L., Price M., Hersh B., Edelson M., Pasternak G.W. (1989). Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488 sensitive K1 subtypes and a novel K3 subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 461-468.
  - Cohen M.L., Shuman R.T., Osborne J.J., Gesellchen P.D. (1986). Opioid agonist activity of ICI 174864 and its carboxypeptidase degradation product, LY281217. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 769-772.
  - Cole J.L., Leventhal L., Pasternak G.W., Bowen W.D., Bodnar R.J. (1995). Reductions in body weight following chronic central opioid receptor subtype antagonists during development of dietary obesity in rats. *Brain Res.* 678: 168-176.
  - Coltro Campi C., Clarke G.D. (1995). Effects of highly selective kappa-opioid agonist on EEG power spectra and behavioural correlates in conscious rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51(4): 611-616.
  - Contreras P.C., Tam L., Drower E., Rafferty M.F. (1993). [ $^3$ H] Naltrindole: a potent and selective ligand for labelling  $\delta$ -opioid receptors. *Brain Res.* 604: 160-164.
  - Cooper S.J., Kirkham T.C. (1993). Opioid mechanisms in the control of food consumption and taste preferences. En *Handbook of Experimental Pharmacology* (Editado por Herz A.), Vol. 104/II, Opioids II, pp. 239-262. Springer-Verlag, Berlin.
  - Corbett A.D., McKnight S., Henderson G. (1999). Opioid receptors. Review title. Tocris. TIPS. 1999. Receptor & ion channel nomenclature supplement (Elsevier Trends Journal).
  - Corbett A.D., Paterson S.J., Kosterlitz H.W. (1993). Selectivity of ligands for opioid receptors. En *Handbook of Experimental Pharmacology* (Editado por Herz A.), Vol. 104, Opioids I, pp. 645-679. Springer, New York.
  - Corbett A.D., Paterson S.J., McKnight A.T., Magnan J., Kosterlitz H.W. (1982). Dynorphin  $_{1-9}$  and dynorphin  $_{1-9}$  are ligands for the  $\kappa$ -subtype of opiate receptor. *Nature* 299: 79-81.
  - Cotterrell M., Balazs R., Johnson A.L. (1972). Effects of corticosteroids on the biochemical maturation of rat brain: postnatal cell formation. *J. Neurochem.* 19: 2151-2167.
  - Cotton R., Giles M.B., Miller L., Shaw J.S., Timms D. (1984). ICI 174,864 a highly selective antagonist for the  $\delta$  opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 97: 331-332.
  - Cover P.O., Buckingham J.C. (1989). Effects of selective opioid receptor blockade on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses to surgical trauma in the rat. *J. Endocrinol.* 211-213.
  - Cowan A., Rance M.J., Blackburn T.P. (1986). In vivo studies on delta opioid receptors. *Natl. Inst. Drug. Abuse Monogr. Ser.* 75: 473-476.
  - Cowan A., Zhu X.Z., Porreca F. (1985). Studies in vivo with ICI 174, 864 and D-Pen $^2$ , D-Pen $^5$  enkephalin. *Neuropeptides* 5: 311-314.
  - Cox B.M., Goldstein A., Li C.H. (1976). Opioid activity of a peptide, beta endorphin (61-91), derived from beta-lipotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 1821-1823.

- 
- Coyle J.T., Pert C.B. (1976). Ontogenetic development of [<sup>3</sup>H] naloxone binding in rat brain. *Neuropharmacology* 15: 555-560.
  - Crabtree B.L. (1984). Review of naltrexone, a long-acting opiate antagonist. *Clin. Pharmacol.* 3: 273-280.
  - Crook T.J., Kitchen I., Hill R.G. (1992). Effects of the  $\delta$ -opioid receptor antagonist naltrindole on antinociceptive responses to selective  $\delta$ -agonists in post-weanling rats. *Br. J. Pharmacol.* 107: 573-576.
  - D'Amore A., Marano G., Loizzo A. (1993). Reduced antinociceptive response to beta-endorphin in adults mice after chronic neonatal handling. *Physiol Behav.* 53: 1025-1027.
  - Dauge V., Rossignol P., Roques B.P. (1989). Blockade of dopamine receptors reverses the behavioral effects of endogenous enkephalins in the nucleus caudatus but not in the nucleus accumbens: differential involvement of delta and mu opioid receptors. *Psychopharmacology* 99(2): 168-175.
  - Dawson-Basoa M., Gintzler A.R. (1997). Involvement of spinal cord delta opiate receptors in the antinociception of gestation and its hormonal stimulation. *Brain Res.* 757(1): 37-42.
  - De Cabo C., Kelly M., Kitchen I., Viveros M.P. (1992a). Effects of neonatal sexual isolation on  $\mu$  receptor development and nociceptive responses in the rats. *Neurosci. Res. Commun.* 10: 79-86.
  - De Cabo C., Kitchen I., Viveros M.P. (1992b). Adaptation of antinociceptive procedures to developing animals. *Sci. Tech. Anim. Lab.* 17: 145-148.
  - De Cabo C., Kitchen I., Kelly M., Viveros M.P. (1993). Effects of  $\beta$ - funaltrexamine treatment and sexual isolation in the perinatal period on the development of  $\mu$ -opioid receptors and nociception. *Psychoneuroendocrinology* 18: 415-424.
  - De Cabo C., Colado M.I., Pujol A., Martin M.I., Viveros M.P. (1994). Naltrexone administration effects on regional brain monoamines in developing rats. *Brain. Res. Bull.* 34: 395-406.
  - De Cabo C., Pujol A., Viveros M.P. (1995). Neonatally administered naltrexone affects several behavioral responses in adult rats of both genders. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50: 277-286.
  - De Cabo C., Viveros M.P. (1997). Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.* 19:499-509.
  - De Costa B.R., Band L., Rothman R.B., Jacobson A.E., Bykov V., Pert A., Rice K.C. (1989). Synthesis of an affinity ligand ("UPHIT") for in vivo acylation of the  $\kappa$ -opioid receptor. *FEBS Lett.* 249: 178-182.
  - De Souza E.B., Van Loon G.R. (1982). D-Ala- Met- enkephalinamide, a potent opioid peptide, alters pituitary adrenocortical secretion in rats. *Endocrinology* 111: 1483.
  - Degli Uberti E.C., Petraglia F., Bondanelli A.L., Guo A.L., Valentini A., Salvadori S., Criscuolo M., Nappi R.E., Genazzani A.R. (1995). Involvement of  $\mu$ -opioid receptor in the modulation of pituitary-adrenal axis in normal and stressed rats. *J. Endocrinol. Invest.* 18: 1-7.
  - Denenberg V.H. (1999). Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy?. *Dev. Psychobiol.* 34(1): 1-3.
  - Denenberg V.H., Zarrow M.X. (1971). Effects of handling in infancy upon adult behavior and adrenocortical activity: suggestions for a neuroendocrine mechanism. En *Early childhood: the developing of a self-regulating mechanism* (Editado por Walcher D.N., Peters D.L.), pp. 39-71.

Academic Press, New York.

- Dettmar P.W., Cowan A., Walter D.S. (1978). Naloxone antagonizes behavioural effects of d-amphetamine in mice and rats. *Neuropharmacology* 17: 1041-1044.
- Diamond M.C. (1987). Sex differences in the rat forebrain. *Brain Research Review* 12: 235-240.
- Di Chiara G., Imperato A. (1988). Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244:1067-1080.
- Dondio G., Ronzoni S., Petrillo P. (1997). Non-peptide delta opioid agonists and antagonists. *Exp. Opin. Ther. Patents.* 7(10): 1075-1098.
- Dores R.M., McDonald L.K., Goldsmith A., Deviche P., Rubin D.A. (1993). The phylogeny of the enkephalins: Speculations on the origins of the opioid precursors. *Cell. Physiol. Biochem.* 3: 231-244.
- Drago F., Genazzani A.A. (1991). Prolactin affects adaptation and dysfunction to stress in the rat. En *Stress and related disorders: from adaptation to dysfunction* (Editado por Genazzani A.R., Nappi G., Petraglia F., Martignoni E.), pp. 151-156. The Parthenon Publishing Group, Lancs, New Jersey.
- Drower E.J., Stapelfeld A., Rafferty M.F., De Costa B.R., Rice K.C., Hammond D.L. (1991). Selective antagonism by naltrindole of the antinociceptive effects of the delta opioid agonist cyclic [D-Penicillamine<sup>2</sup>-D-Penicillamine<sup>5</sup>] enkephalin in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 725-731.
- Dupin S., Tafani J.A.M., Mazarguil H., Zajac J.M. (1991). [<sup>125</sup>I][D-Ala<sup>2</sup>]deltorphin-I: a high affinity, delta selective opioid receptor ligand. *Peptides* 12: 825-830.
- Durand M., Sarrieau A., Aguerre S., Mormede P., Chaouloff F. (1998). Differential effects of neonatal handling on anxiety, corticosterone response to stress, and hippocampal glucocorticoid and serotonin (5-HT)<sub>2A</sub> receptors in Lewis rats. *Psychoneuroendocrinology* 23 (4): 323-335.
- Duvauchelle C.L., Fleming S.M., Kornetsky C. (1996). Involvement of delta- and mu-opioid receptors in the potentiation of brain-stimulation reward. *Eur. J. Pharmacol.* 316: 137-143.
- Eason M.G., Francis R.S., Kuhn C.M. (1996).  $\mu$ -Opioid agonists stimulate growth hormone secretion in immature rats. *Neuroendocrinology* 63: 489-497.
- Eisenberg R.M. (1980). Effects of naloxone on plasma corticosterone in the opiate-naive rat. *Life Sci.* 26:935-943.
- Eisenberg R.M. (1985). Plasma corticosterone changes in response to central or peripheral administration of kappa and sigma opiate agonists. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 233:863-869.
- Eisenberg R.M. (1993). DAMGO stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis through a mu-2 opioid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993. 266(2): 985-991.
- Eisenberg R.M. (1994). TRIMU-5 a mu 2-opioid receptor agonist, stimulates the hypothalamo-pituitary- adrenal axis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47 (4): 943-946.
- Emmerson P.J., Liu M.R., Woods J.H. Medzihradsky F. (1994). Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271: 1630-1637.
- Emrich H.M., Schmauss C. (1991). Psychiatric aspects of opioid research. En *Neurobiology of opioids* (Editado por Almeida, O.F.X., Shippenberg T.S.), pp. 363-367. Berlín, Springer-Verlag.
- Engele J., Pilgrim Ch., Reisert I. (1987). Nigrostriatal dopaminergic neurons in culture are sexually

dimorphic. *Neuroscience* 22:S235.

- Engele J., Pilgrim Ch., Reisert I. (1989). Sexual differentiation of mesencephalic neurons in vitro: effects of sex and gonadal hormones. *Int. J. Dev. Neurosci.* 7: 603.
- Erspamer V., Melchiorri P., Falconieri-Erspamer G., Negri L., Corsi R., Severini C., Barra D., Simmaco M., Kreil G. (1989). Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta-opioid binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86: 5188-5192.
- Evans C.J., Keith D.E., Morrison H., Magendzo K., Edwards R.H. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258: 1952-1955.
- Fang F.G., Fields H.L., Lee N.M. (1986). Action at the mu receptor is sufficient to explain the supraspinal effects of opiates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 1039-1044.
- Fang L., Knapp R.J., Horvath R., Matsunaga T.O., Haaseth R.C., Hruby V.J., Porreca F., Yamamura H.I. (1994). Characterization of [<sup>3</sup>H] naltrindole binding to delta opioid receptors in mouse brain and mouse vas deferens: evidence for delta opioid receptor heterogeneity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 836-846.
- Fanselow M.S., Bolles R.C. (1979). Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93:736-744.
- Feine J.S., Bushnell M.C., Miron D., Duncan G.H. (1991). Sex differences in the perception of noxious heat stimuli. *Pain* 44 (3): 255-262.
- Ferger B., Kuschinsky K. (1995). Effects of morphine on EEG in rats and their possible relations to hypo- and hyperkinesia. *Psychopharmacology* (Berlin). 117: 200-207.
- Fernández-Ruiz J.J., Rodríguez de Fonseca F., Navarro M., Ramos J.A. (1992). Maternal cannabinoid exposure and brain development: Changes in the ontogeny of dopaminergic neurons. En *Neurobiology and neurophysiology of cannabinoids, biochemistry and physiology of substance abuse* (Editado por Bartke A., Murphy L.L.), Vol. IV, pp. 119-164. Boca Raton, FL. CRC Press.
- Fernández-Ruiz J., Romero J., García L., García-Palomero E., Ramos J.A. (1996). Dopaminergic neurons as neurochemical substrates of neurobehavioral effects of marijuana: Developmental and adult studies. En *Dopamine Disease States*. (Editado por Beninger R.J., Archer T., Palomo T.), pp. 359-387. CYM Press. Madrid, Spain.
- Ferre P., Nuñez J.F., García E., Tobena A., Escorihuela R.M., Fernández-Teruel A. (1995). Postnatal handling reduces anxiety as measured by emotionality rating and hyponeophagia tests in female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51 (2-3): 199-203.
- Ferri S., Candeletti S., Cocchi D., Giagnoni G., Rossi T., Scoto G., Sarpinato S. (1982) Interplay between opioid peptides and pituitary hormones. En *Regulatory peptides: from molecular biology to function* (Editado por Costa E., Trabucchi M.), pp. 109. Raven Press, New York.
- File S.E., Wardill A.G. (1975). Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified holeboard. *Psychopharmacology* (Berlin) 44: 53-59.
- File S.E. (1978a). Exploration, distraction, and habituation in rats reared in isolation. *Dev. Psychobiol.* 11(1): 73-81.
- File S.E. (1978b). The ontogeny of exploration in the rat: habituation and effects of handling. *Dev. Psychobiol.* 11 (4): 321-328.
- File S.E. (1980). Naloxone reduces social and exploratory activity in the rat. *Psychopharmacology* 71: 41-44.

- 
- File S.E. (1992). Behavioral detection of anxiolytic action. En *Experimental approaches to anxiety and depression* (Editado por Elliot J.M., Heal J., Marsden C.A ), pp. 25-44. Wiley, New York.
  - Fillingim R.B., Maixner W. (1995). Gender differences in the responses to noxious stimuli. *Pain Forum*. 4: 209-221.
  - Finnerty E.P., Chan S.H.H. (1981). The participation of substantia nigra compacta and zona reticulata neurons in morphine suppression of caudate spontaneous neuronal activities in the rat. *Neuropharmacology* 20: 241-246.
  - Forman L.J., Cavalieri T., Estilow S., Tatarian G.T. (1990). The elevation of immunoreactive beta-endorphin in old male rats is related to alterations in dopamine and serotonin. *Neurobiol. Aging*. 11: 223-227.
  - Fowler C.J., Fraser G.L. (1994).  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -opioid receptors and their subtypes. A critical review with emphasis on radioligand binding experiments. *Neurochem. Int.* 24: 401-426.
  - Fox-Threlkeld J.A.E.T., Daniel E.E., Christinck F., Hruby V.J., Cipris S., Woskowska Z. (1994). Identification of mechanisms and sites of action of mu and delta receptor activation in the canine intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 689-700.
  - France C.P., Medzihradsky F., Woods J.H. (1994). Comparison of kappa opioids in rhesus monkeys: behavioral effects and receptor binding affinities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 47-58.
  - Fukuda K., Kato S., Mori K., Nishi M., Takeshima H. (1993). Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta and mu-subtypes. *FEBS Lett* 327: 311-314.
  - Fuller R.W. (1984). Serotonin receptors. *Monogr. Neural Sci.* 10: 158-181.
  - Gacel C., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P. (1980). D-Tyr-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr, a highly preferential ligand for delta opiate receptors. *FEBS Lett.* 118: 245-247.
  - Gadek-Michalska A., Bugajski J. (1996). Stimulatory effect of intracerebroventricular met- and leu-enkephalin on corticosterone secretion in rats. *Folia Med. Cracov.* 37 (3-4): 3-12.
  - Gavériaux-Ruff C., Matthes H.W., Peluso J., Kieffer B.L. (1998). Absence of morphine immunosuppression in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:6326-6330.
  - Georges F., Normand E., Bloch B., Le Moine C. (1998). Opioid receptor gene expression in the rat brain during ontogeny, with special reference to the mesostriatal system: an in situ hybridization study. *Dev. Brain Res.* 109:187-199.
  - Giardino L., Calza L., Montanini V., Velardo A., Baraghini G.F., Battistini N., Marrama P., Tiengo M. (1990). Functional plasticity of opioid peptides. In: Benedetti C. et al. Eds. *Advances in pain research and therapy*, vol 14. New York. Raven Press 87-106.
  - Gibson A., Ginsburg M., Hall M., Hart S.L. (1979). The effects of opiate receptor agonists and antagonists on the stress-induced secretion of corticosterone in mice. *B. J. Pharmacol.* 65: 139-146.
  - Goody R., Antelo M.T., Fernández B., Viveros M.P., Kitchen I. (1998). Changes in opioid receptors in the brain of preweanling male and female rats following chronic treatment with naltrindole. *29 International Narcotics Research Conference*. Julio 1998.
  - Goldstein A. (1984). Biology and chemistry of the dynorphin peptides. En *The Peptides* (Editado por Udenfriend S., Meienhofer S.), pp. 95-145. Academic Press, London.
  - Goldstein A., Fischli W., Lowney L.I., Hunkapiller M., Hood L. (1981). Porcine pituitary dynorphin:

- complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7219-7223.
- Goldstein A., Lowney L.I., Pal B.K. (1971). Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1742-1747.
  - González M.L., Milanes M.V., Vargas M.L. (1991). Effects of acute and chronic administration of mu- and delta-opioid agonists on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* Jul 23; 200(1): 155-158.
  - González M.L., Vargas M.L., Milanes M.V. (1994). Lack of involvement of delta-opioid receptor in mediating physical dependence at the hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis in the rat. *Gen. Pharmacol.* Jul 25(4): 719-723.
  - Graeff F.G., Audi E.A., Almeida S.S., Graeff E.O., Hunziker M.H.L. (1990). Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. *Neurosci. Behav. Rev.* 14: 501-506.
  - Gray J.A. (1971). Sex differences in emotional behaviour in mammals including man: endocrine bases. *Acta Psychol.* 315: 29-46.
  - Gray J.A. (1991). The psychology of fear and stress. Problems in the Behavioural Sciences, 5. (Reimpresión corregida de la 2ª ed. 1987) Cambridge University Press, Cambridge (Reino Unido), 422 pag.
  - Gray J.A., Drewett R.F., Lajilee B. (1975). Effects of neonatal castration and testosterone injection on adult open-field behavior in rats with atypical sex difference in defecation. *Anim. Behav.* 23: 773-778.
  - Gray J.A., Lajilee B. (1974). Sex differences in emotional behavior in the rat: correlation between open-field defecation and active avoidance. *Anim. Behav.* 22: 856-861.
  - Gray J.A., Lean J., Keynes A. (1969). Infant androgen treatment and adult open-field behaviour: direct effects and effects of injections to siblings. *Physiol. Behav.* 4: 177-181.
  - Gray J.A., Levine S., Broadhurst P.L. (1965). Gonadal hormone injections in infancy and adult emotional behavior. *Anim. Behav.* 13 (1): 33-45.
  - Grevel J., Yu V., Sadee W. (1985). Characterization of a labile naloxone binding site ( $\lambda$  site) in rat brain. *J. Neurochem.* 44: 1647-1656.
  - Grevert P., Goldstein A. (1977). Some effects of naloxone on behavior in the mouse. *Psychopharmacology* 53 : 111-113.
  - Grossen N.E., Kelley M.J. (1972). Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81: 307-310.
  - Guaza C., Torrellas A., Borrel J., Borrel S. (1979). Effects of morphine upon the pituitary-adrenal system and adrenal catecholamines: a comparative study in cats and rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11: 57-63.
  - Guillemin R., Ling N., Burgus R. (1976). Endorphins, hypothalamic and neurohypophysial peptides with morphinomimetic activity: isolation and molecular structure of alfa-endorphin. *C.R. Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci. D.* 282(8): 783-785.
  - Haddad G.G., Schaeffer J.I., Chang K.J. (1984). Opposite effects of  $\delta$  and  $\mu$  opioid receptor agonists on ventilation in conscious adult dogs. *Brain. Res.* 323: 73-82.

- 
- Hahn E.F., Carroll-Buatti M., Pasternak G.W. (1982). Irreversible opiate agonists and antagonists: The 14-hydroxydihydromorphinone azines. *J.Neurosci.* 2:572.
  - Haltmeyer G.C., Denenberg V.H., Thatcher J., Zarrow M.X. (1966). Response of the adrenal cortex of the neonatal rat after subjection to stress. *Nature* 212: 1371-1373.
  - Hammer R.P. (1990).  $\mu$ -opiate receptor binding in the medial preoptic area is cyclical and sexually dimorphic. *Brain Res.* 515:187-192.
  - Hammer R.P., Ricalde A.A., Seatriz J.V. (1989). Effects of opiates on brain development. *Neurotoxicology* 10: 475-484.
  - Handa B.K., Land A.C., Lord J.A., Morgan B.A., Rance M.J., Smith C.F. (1981). Analogues of beta-LPH61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 70: 531-540.
  - Handler C.M., Piliero T.C., Geller E.B., Adler M.W. (1994). Effect of ambient temperature on the ability of mu-, kappa- and delta-selective opioid agonists to modulate thermoregulatory mechanisms in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 847-855.
  - Haney M., Miczek K.A. (1994). Ultrasounds emitted by female rats during agonistic interactions: effects of morphine and naltrexone. *Psychopharmacology* 114: 441-448.
  - Haney M., Miczek K.A. (1995). Delta opioid receptors: reflexive, defensive and vocal affective responses in female rats. *Psychopharmacology* 121: 204-212.
  - Hansen P.E., Morgan B.A. (1984). Structure-activity relationship in enkephalin peptides. In *The Peptides*, ed. J. Meienhofer and S. Udenfriend vol. 6. pp. 269-321. Academic Press. New York.
  - Harry G.J., Rosecrans J.A. (1979). Behavioral effects of perinatal naltrexone exposure: a preliminary investigation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11 (suplem.) 19-22.
  - Hart S.L., Slusarczyk H., Smith T.W. (1985). The effects of selective opioid  $\delta$  receptor antagonists on stress-induced antinociception and plasma corticosterone levels in mice. *Neuropeptides* 5: 303-306.
  - Havemann U., Kuschinsky K. (1985). Locomotor activity of rats after injection of various opioids into the nucleus accumbens and septum medial. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 331: 175-180.
  - Hawkins K.N., Knapp R.J., Gehlert D.R., Lui G.K., Yamamura M.S., Roeske L.C., Hruby V.J., Yamamura H.I. (1988). Quantitative autoradiography of [ $^3$ H]-CTOP binding to mu opioid receptors in rat brain. *Life Sci.* 42: 2541-2551.
  - Hayes A., Stewart B.R. (1985). Effect of  $\mu$  and  $\kappa$  opioid receptor agonists on rat plasma corticosterone levels. *Eur. J. Pharmacol.* 116: 75-79.
  - Hecht A., Schiorring E. (1979). Behavior effects of low and high acute doses of morphine in solitary mice. *Psychopharmacology* 64: 73-81.
  - Henderson G., McKnight A.T. (1997). The orphan opioid receptor and its endogenous ligand-nociception/orphanin FQ. *TIPS* 18: 293-300.
  - Henning S.J. (1978). Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am. J. Physiol.* 235: E451-456.
  - Herrenkohl L.R., Ribary U., Schlumpf M., Lichtensteiger W. (1988). Maternal stress alters monoamine metabolites in fetal and neonatal rat brain. *Experientia* 44(5): 457-459.
  - Heyman J.S. (1987). Modulation of supraspinal  $\mu$  opioid inhibition of gastrointestinal propulsion by  $\delta$

- agonists in the mouse. *Gastroenterology* 92: P1801.
- Heyman J.S., Jiang Q., Rothman R., Mosberg H., Porreca F. (1989a). Modulation of  $\mu$ -mediated antinociception by  $\delta$  agonist: characterization with antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 169: 43-52.
  - Heyman J.S., Vaught J.L., Mosberg H.I., Haaseth R.C., Porreca F. (1989b). Modulation of  $\mu$  mediated antinociception by  $\delta$  agonists in the mouse: selective potentiation of morphine and normorphine by [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]-enkephalin. *Eur. J. Pharmacol.* 165: 1-10.
  - Heyman J.S., Mulvaney S.A., Mosberg H.I., Porreca F. (1987a). Opioid  $\delta$  receptor involvement in supraspinal and spinal antinociception in mice. *Brain Res.* 420: 100-108.
  - Heyman J.S., Mosberg H.I., Porreca F. (1987b). Species dependent analgesic effects of [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]-enkephalin (DPDPE). *Pharmacologist.* 29: 106-109.
  - Heyman J.S., Vaught J.L., Raffa R.B., Porreca F. (1988). Can supraspinal delta-opioid receptors mediate antinociception?. *Trends Pharmacol. Sci.* 9: 134-138.
  - Hilakivi-Clarke L.A., Turkka J., Lister R.G., Linnoila M. (1991). Effects of early postnatal handling on brain beta-adrenoreceptors and behavior in tests related to stress. *Brain Res.* 542 (2): 286-292.
  - Hitzemann R., Currel J., Hom D., Loh H. (1982). Effects of naloxone on d-amphetamine- and apomorphine-induced behavior. *Neuropharmacology* 21: 1005-1011.
  - Holaday J.W., D'Amato R.J. (1983). Multiple opioid receptors: evidence for  $\mu$ - $\delta$  binding site interactions in endotoxic shock. *Life Sci.* 33: 703-706.
  - Holaday J.W., Porreca F., Rothman R.B. (1990). Functional coupling among opioid receptor types: implications for anesthesiology. En *Opioids in anesthesia II* (Editado por Estafanous F.G.), pp. 50-60. Boston, Butterworth-Heinemann Publishers.
  - Höllt V. (1986). Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26: 59-77.
  - Höllt V. (1991). Opioid peptides genes: structure and regulation. En *Neurobiology of Opioids* (Editado por Almeida O.F.X., Shippenberg T.S.), pp. 11-51. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg.
  - Holtzman S.G. (1974). Behavioral effects of separate and combined administration of naloxone and d-amphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 189: 51-60.
  - Holtzman S.G. (1975). Effects of narcotic antagonists on fluid intake in the rat. *Life Sci.* 16: 1465-1470.
  - Hollister L.E., Johnson K., Boukhabza D., Gillespie H.K. (1981). Aversive effects of naltrexone in subjects not dependent on opiates. *Drug Alcohol Depend* 7: 1-5.
  - Hom J.S.H., Pan Y.X., Brooks A.I., Standifer K.M., Mathis J.P., Scheinberg D.A., Pasternak G.W. (1995). Characterization of the kappa<sub>3</sub>-like opioid receptor on Raji B lymphoma cells (Abstract). *Soc. Neurosci.* 21: 527.
  - Hommer D.W., Pert A. (1983). The actions of opiates in the rat substantia nigra: an electrophysiological analysis. *Peptides* 4: 603-607.
  - Honkanen A., Korpi E.R., Holopainen I., Ahtee L. (1995). Repeated alcohol and morphine treatment differently affect locomotor activity in rats selectively bred for different alcohol preference. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21: 729.
  - Hooks M.S., Jones D.N.C., Justice J.B., Holtzman S.G. (1992). Naloxone reduces amphetamine-

- induced stimulation of locomotor activity and in vivo dopamine release in the striatum and nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42: 765-770.
- Horan P.J., De Costa B.R., Rice K., Haaseth R.C., Hruby V.J., Porreca F. (1993). Differential antagonism of bremazocine- and U69,593-induced antinociception by quadazocine: further functional evidence of opioid  $\kappa$  receptor multiplicity in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 926-933
  - Horan P., De Costa B.R., Rice K.C., Porreca F. (1991). Differential antagonism of U69,593 and bremazocine by (-)-UPHIT: evidence of kappa opioid receptor multiplicity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 1154-1161.
  - Horan P., Taylor J., Yamamura H.I., Porreca F. (1992). Extremely long-lasting antagonistic actions of nor-binaltorphimine (nor-BNI) in the mouse tail-flick test. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 1237-1242.
  - Howard E., Benjamin J.A. (1975). DNA, ganglioside and sulfatide in brains of rats given corticosterone in infancy, with an estimate of cell loss during development. *Brain Res.* 92: 73-87.
  - Hughes J. (1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88: 295-308.
  - Hughes J., Smith T.W., Kosterlitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A., Morris H.R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature (Lond.)* 258: 577-579.
  - Hunter J.C., Leighton G.E., Meecham K.G., Boyle S.J., Horwell D.C., Ress D.C., Hughes J. (1990). CI-977, a novel and selective agonist for the  $\kappa$  opioid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 101: 183-189.
  - Hutchison M., Kosterlitz H.W., Leslie F.M., Waterfield A.A., Terenius L. (1975). Assessment in the guinea pig ileum and mouse vas deferens of benzomorphans, which have antinociceptive activity but do not substitute for morphine in dependent monkey. *Br. J. Pharmacol.* 55: 541-546.
  - Imori K., Tanaka Y., Kohno Y., Ida Y., Nakagawa R., Hoaki Y., Tsuda A., Nagasaki N. (1982). Psychological stress enhances noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16: 637-640.
  - Illes P. (1989). Modulation of transmitter and hormone release by multiple neuronal opioid receptors. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 112: 139-233.
  - Illes P., Jackisch R. (1991). Modulation of catecholamine release in the central nervous system by multiple opioid receptors. En *Neurobiology of Opioids* (Editado por Almeida O.F.X., Shippenberg T.S.), pp. 213-225. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg Nueva York.
  - Imai Y., Wang J.B., Moriwaki A., Uhl G.R. (1994).  $\mu$  opiate receptor: Developmental profile and regulation. *Soc. Neurosci. Abst.* 20: 1727.
  - Improta G., Broccardo M. (1992). Spinal antinociceptive effects of [D-Ala<sup>2</sup>]-deltorphin II, a novel and highly selective delta-opioid receptor agonist. *Peptides* 13: 1123-1126.
  - Iny L.J., Gianoulakis C., Palmour R., Meaney M.J. (1987). The  $\beta$ -endorphin response to stress during postnatal development in the rat. *Dev. Brain Res.* 31: 177-181.
  - Isayama T., Hurst W.J., McLaughlin P.J., Zagon I.S. (1995). Ontogeny of the opioid growth factor, [Met<sup>5</sup>]-enkephalin, and its binding activity in the retina. *Visual Neurosci.* 12: 939-950.
  - Iwamoto E.T. (1981). Locomotor activity and antinociception after putative mu, Kappa and sigma opioid receptor agonist in the rat: Influence of dopaminergic agonists and antagonists. *J. Pharmacol.*

*Exp. Ther.* 217: 451-460.

- Iwamoto E.T. (1984). An assessment of the spontaneous activity of rats administered morphine, phencyclidine, or nicotine using automated and observational methods. *Psychopharmacology* (Berlin) 84: 374-378.
- Iyengar S., Kim H.S., Wood P.L. (1986). Kappa opiate agonists modulate the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 429.
- Jackisch R., Geppert M., Lupp A., Huang H.Y., Illes P. (1988). Types of opioid receptors modulating neurotransmitter release in discrete brain regions. En *Regulatory roles of opioid peptides* (Editado por Illes P., Farsang C. ), pp. 240-258. VCH. Weinheim.
- Jackson A., Cooper S.J. (1986). An observational analysis of the effect of the selective kappa opioid agonist U50,488H on feeding and related behaviours in the rat. *Psychopharmacology* (Berlin) 90: 217-221.
- Jackson H.C., Kitchen I. (1989a). Behavioural effects of selective  $\mu$ - $\kappa$  and  $\delta$  opioid agonists in neonatal rats. *Psychopharmacology* 97: 404-409.
- Jackson H.C., Kitchen I. (1989b). Swim-stress-induced antinociception in young rats. *Br. J. Pharmacol.* 96: 617-622.
- Jackson H.C., Kitchen I. (1989). Antinociceptive effects of the  $\mu$ -selective agonist [D-Ala<sup>2</sup> MePhe<sup>4</sup>-Glyol<sup>5</sup>] enkephalin in 10-day old neonatal rats. *Adv. Biosci.* 75: 487-490.
- Jackson H.C., Sewell R.D. (1984). The involvement of  $\mu$ - and  $\kappa$ - but not  $\delta$ -opioid receptors in the body weight gain of suckling rats. *Psychopharmacology.* 84: 143-144.
- Jackson H.C., Ripley T.L., Nutt D.J. (1989). Exploring  $\delta$ -receptor function using the selective opioid antagonist naltrindole. *Neuropharmacology* 28(12): 1427-1430.
- Jacobson M. (1978). Developmental Neurobiology, pp. 61-67. Plenum, Nueva York. (EE.UU)
- James I.F., Goldstein A. (1984). Site-directed alkylation of multiple opioid receptors. I. Binding selectivity. *Mol. Pharmacol.* 25: 337-342.
- James I.F., Fischli W., Goldstein A. (1984). Opioid receptor selectivity of dynorphin gene products. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228: 88-93.
- Janssens P.A.G., Niemggers C.J.E., Dony J.G.H. (1963). The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm-water induced tail withdrawal reflex. *Arzneim. Forsch.* 13: 502-504.
- Jezova D., Vigas M., Jurcovicova J. (1982). ACTH and corticosterone response to naloxone and morphine in normal, hypophysectomized and dexamethasone-treated rats. *Life Sci.* 31: 307-314.
- Jhamandas K., Marien M. (1987). Glutamate-evoked release of endogenous brain dopamine: Inhibition by excitatory amino acid antagonist and an enkephalin analogue. *Br. J. Pharmacol.* 90: 641-650.
- Ji R.R., Zhang Q., Law P.Y., Low H.H., Elde R., Hökfelt T. (1995). Expression of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$  receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J. Neurosci.* 15: 8156-8166.
- Jiang Q., Bowen W.D., Mosberg H.I., Rothman R.B., Porreca F. (1990c). Opioid agonist and antagonist antinociceptive properties of [D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Cys<sup>6</sup>]-enkephalin: Selective actions at the delta<sub>noncomplexed</sub> site. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 636-641.

- 
- Jiang Q., Mosberg H.L., Porreca F. (1990a). Modulation of the potency and efficacy of mu-mediated antinociception by delta agonists in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254: 683-689.
  - Jiang Q., Mosberg H.L., Porreca F. (1990b). Antinociceptive effects of [D-Ala<sup>2</sup>]deltorphin II, a highly selective  $\delta$  agonist in vivo. *Life Sci.* 47: PL43-PL47.
  - Jiang Q., Takemori A.E., Sultana M., Portoghese P.S., Bowen W.D., Mosberg H.L., Porreca F. (1991). Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Cys<sup>6</sup>] enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyanate: evidence for delta-receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 1069-1075.
  - Jiang Q., Sebastian A., Archer S., Bidlack J.M. (1994). 5 $\beta$ -methyl-14 $\beta$ -(p-nitrocinnamoylamino)-7-8-dihydromorphinone and its corresponding N-cyclopropylmethyl analog, N-cyclopropylmethyltynor-5 $\beta$ -methyl-14 $\beta$ -(p-nitrocinnamoylamino)-7-8-dihydromorphinone: mu selective irreversible opioid antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 1107-1113.
  - Johnston A.L., File S.E. (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol. Behav.* 49: 247-250.
  - Johnson P.I., Goodman J.B., Condon R., Stellar J.R., (1995). Reward shifts and motor responses following microinjections of opiate-specific agonists into either the core or shell of the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* (Berlin) 120: 195-202.
  - Jonas J.M., Gold M.S. (1987). Treatment of antidepressant resistant bulimia with naltrexone. *Int. J. Psychiatry Med.* 16: 305-309.
  - Jones D.N.C., Bowen W.D., Portoghese P.S., Holtzman S.G. (1993). Delta-opioid receptor antagonists attenuate motor activity induced by amphetamine but not cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* 249: 167-177.
  - Juma I. (1981). Changes in the activity of nigral neurones induced by morphine and other opiates in rats with intact brain and after pre-nigral decerebration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 316: 149-154.
  - Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H., Noda M., Morimoto Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Nakanishi S., Numa S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine  $\beta$ -neoendorphin/dynorphin precursor. *Nature* (Lond) 298: 245-249.
  - Kakihana R., Blum S., Kessler S. (1974). Developmental study of pituitary-adrenocortical response in mice: plasma and brain corticosterone determination after histamine stress. *J. Endocrinol.* 60: 353-358.
  - Kamei I., Iwamoto Y., Suzuki T., Nagase H., Misawa M., Kasuya Y. (1993). Differential modulation of  $\mu$ -opioid receptor-mediated antitussive activity by  $\delta$  opioid-receptor agonists in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 234: 117-120.
  - Kamei J., Kawashima N., Kasuya Y. (1992). Paradoxical analgesia produced by naloxone in diabetic mice is attributable to supersensitivity of  $\delta$  opioid receptors. *Brain Res.* 592: 101-105.
  - Kamata K. (1987). Pharmacological studies on the interrelation between the dopaminergic, GABAergic and opioid peptidergic systems in the central nervous system of the rat. *Japan. J. Pharmacol.* 45: 439-447.
  - Kant G.J., Lenox R.H., Bunnell R.N., Mougey E.H., Pennington L.L., Meyerhoff J.L. (1983). Comparison of stress response in male and female rats: pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology* 8: 421-428.
  - Kastin A., Kostorzewa R.M., Schally A.V., Coy D.H. (1980). Neonatal administration of met-enkephalin

- facilitates maze performance of adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13: 883-886.
- Katoh A., Nabeshima T., Kameyama T. (1990). Behavioral changes induced by stressful situations: effects of enkephalins, dynorphin and their interactions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 600-607.
  - Katz R.J. (1979). Naltrexone antagonism of exploration in the rat. *Int. J. Neurosci.* 9: 49-51.
  - Katz R.J. (1988). Endorphins, exploration and activity. En *Endorphins, Opiates, and Behavioural Processes* (Editado por Rodgers R.J. y Cooper S.J.), pp. 249-267. Wiley, Chichester, West Sussex, England.
  - Katz R.J., Gelbart J. (1978). Endogenous opiates and behavioral responses to environmental novelty. *Behav. Biol.* 24:338-348.
  - Kazmierski W., Wire W.S., Lui G.K., Knapp R.J., Shook J.E., Burks T.F., Yamamura H.I., Hruby V.J. (1988). Design and synthesis of somatostatin analogues with topographical properties that lead to highly potent and specific mu opioid receptor antagonists with greatly reduced binding at somatostatin receptors. *J. Med. Chem.* 31: 2170-2177.
  - Kehoe P., Boylan C.B. (1994). Behavioral effects of kappa-opioid-receptor stimulation on neonatal rats. *Behav. Neurosci.* 108: 418-423.
  - Kelley A.E., Bless E.P., Swanson C.J. (1996). Investigation of the effects of opiate antagonists infused into the nucleus accumbens on feeding and sucrose drinking in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278: 1499-1507.
  - Kelly M.D. (1996). The ontogeny of delta and kappa receptors in the rat. Tesis Doctoral. School of Biological Sciences. University of Surrey. Guildford, Surrey, England.
  - Kelly M.D., Hill R.G., Borsodi A., Toth G., Kitchen I. (1998). Weaning-induced development of delta-opioid receptors in rat brain: differential effects of guanine nucleotides and sodium upon ligand-receptor recognition. *Br. J. Pharmacol.* 125 (5): 979- 986.
  - Kepler K.L., Standifer K.M., Paul D., Kest B., Pasternak G.W., Bodnar R.J. (1991). Gender effects and central opioid analgesia. *Pain* 45(1): 87-94.
  - Kest B., Wilson S.G., Mogil J.S. (1999). Sex differences in supraspinal morphine analgesia are dependent on genotype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289(3): 1370-1375.
  - Kieffer B.L. (1995). Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15: 615-635.
  - Kieffer B.L. (1999). Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 19-26.
  - Kieffer B.L., Befort K., Gavériaux-Ruff C., Hirth C.G. (1992). The  $\delta$ -opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12048-12052.
  - Kim H.S., Iyengar S., Wood P.L. (1986). Opiate actions on mesocortical metabolism in the rat. *Life Sci.* 39: 2033-2036.
  - Kitchen I., Crook T.J., Muhammad B.Y., Hill R.G. (1994). In vivo evidence for the differential development of  $\delta$ -opioid receptor subtypes. *Dev. Brain. Res.* 78: 147-150.
  - Kitchen I., Kelly M.D.W., De Cabo C. (1995a).  $\kappa$ - and  $\delta$ - opioid receptor mediated antinociception in preweanling rats. *Analgesia* 1: 512-515.
  - Kitchen I., Kelly M.D.W., Viveros M.P. (1990). Ontogenesis of  $\kappa$  opioid receptors in rat brain using

- [<sup>3</sup>H]U69593 as a binding ligand. *Eur. J. Pharmacol.* 175: 93-96.
- Kitchen I., Leslie F.M., Kelly M., Barnes R., Crook T.J., Hill R.G., Borsodi A., Toth G., Melchiorri P., Negri L. (1995b). Development of delta-opioid receptor subtypes and the regulatory role of weaning: radioligand binding, autoradiography and *in situ* hybridization studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275: 1597-1607.
  - Kitchen I., McDowell J., Winder C., Wilson J.M. (1984). Low-level lead exposure alters morphine antinociception in neonatal rats. *Toxicol. Lett.* 22: 119-123.
  - Kitchen I., Pinker S.R. (1990). Antagonism of swim-stress-induced antinociception by the  $\delta$ -opioid receptor antagonist naltrindole in adult and young rats. *Br. J. Pharmacol.* 100: 685-688.
  - Kitchen I., Rowan K.M. (1984). Differences in the effects of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptor antagonists upon plasma corticosterona levels in stressed mice. *Eur. J. Pharmacol.* 101:153-156.
  - Kitchen I., Slowe S.J., Matthes H.W.D., Kieffer B.L. (1997). Quantitative autoradiographic mapping of mu, delta and kappa opioid receptors in knock-out mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Br. Res.* 778: 73-78.
  - Klitenick M.A., Wirtshafter D. (1995). Behavioral and neurochemical effects of opioids in the paramedian midbrain tegmentum including the median raphe nucleus and ventral tegmental area. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273: 327-336.
  - Knapp R.J., Malatynska E., Collins N., Fang L., Wang J.Y., Hruby V.J., Roeske W.R., Yamamura H.I. (1995). Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *FASEB* 9: 516-525.
  - Knapp R.J., Malatynska E., Fang L., Li X., Babin E., Nguyen M., Santoro G., Varga E., Hruby V.J., Roeske W.R., Yamamura H.I. (1994). Identification of a human delta opioid receptor: cloning and expression. *Life Sci.* 54: PL463-469.
  - Knapp R.J., Porreca F., Burks T.F., Yamamura H.I. (1989). Mediation of analgesia by multiple opioid receptors. En *Advances in Pain Research and Therapy* (Editado por Hill C.S. Jr., Fields W.S.), pp. 247-289. Raven Press, New York.
  - Kokka N., García J.F., Elliot H.W. (1973). Effects of acute and chronic administration of narcotic analgesics in growth hormone and corticotropin (ACTH) secretion in rats. *Prog. Brain. Res.* 37:347-360.
  - Köning M., Zimmer A.M., Steiner H., Holmes P.V., Crawley J.N., Brownstein M.J., Zimmer A. (1996). Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature* 383: 535-538.
  - Kornblum H.I., Hurlbut D.E., Leslie F.M. (1987). Postnatal development of multiple opioid receptors in rat brain. *Dev. Brain. Res.* 37: 21-41.
  - Kosterlitz H.W., Lord J.A.H., Paterson S.J., Waterfield A.A. (1980). Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with mu and delta receptors. *Br. J. Pharmacol.* 68: 333-342.
  - Kosterlitz H.W., Paterson S.J., Robson L.E. (1981). Characterization of the  $\kappa$ -subtype of the opiate receptor in the guinea-pig brain. *Br. J. Pharmacol.* 73:939-949.
  - Kovács G.L., De Wied D. (1978). Effects of amphetamine and haloperidol on avoidance behavior and exploratory activity. *Eur. J. Pharmacol.* 53: 103-107.
  - Kozak W., Conn C.A., Dluger M.J. (1995). Body temperature, motor activity and feeding behavior of mice treated with beta-chlornaltrexamine. *Physiol. Behav.* 58: 353-362.

- 
- Krishnan-Sarin S., Jing S.L., Kurtz D.L., Zweifel M., Portoghesi P.S., Li T.K., Froelich J.C. (1995). The delta opioid receptor antagonist naltrindole attenuates both alcohol and saccharin intake in rats selectively bred for alcohol preference. *Psychopharmacology* 120: 177-185.
  - Kshama D., Hrishikeshavan H.J., Shanbhogue R., Munonyedi U.S. (1990). Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. *Behav. Neur. Biol.* 54:234-253.
  - Kuribara H. (1995). Modification of morphine sensitization by opioid and dopamine receptor antagonists: evaluation by studying ambulation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 275: 251-258.
  - Lahti R.A., Collins R.J. (1978). Chronic naloxone results in prolonged increases in opiate binding sites in brain. *Eur. J. Pharmacol.* 51: 185-186.
  - Lahti R.A., Mickelson M.M., McCall J.M., Von Voigtlander P.F. (1985). [<sup>3</sup>H]U-69593, a highly selective ligand for the opioid  $\kappa$  receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 109: 281-284.
  - Lahti R.A., Von Voigtlander P.F., Barsuhn C. (1982). Properties of a selective kappa agonist, U50,488. *Life Sci.* 31: 2257-2260.
  - Lai J., Ma S.W., Zhu R.H., Rothman R.B., Lentes K.U., Porreca F. (1994). Pharmacological characterization of the cloned kappa opioid receptor as a kappa 1b subtype. *Neuroreport* 5: 2161-2164.
  - Langer S.Z. (1981). Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol Rev.* 32: 337-361.
  - Law y col. (1994). Analysis of delta opioid receptor activities stably expressed in CHO cell lines: function of receptor density? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271(3): 1686-1694.
  - Lazarus L.H., Bryant S.D., Attila M., Salvadori S. (1994). Frog skin opioid peptides: a case for environmental mimicry. *Environ. Health Perspect.* 102: 648-654.
  - Leadem C.A., Crowley W.R., Simpkins J.K., Kalra S.P. (1985). Effects of naloxone on catecholamine and LHRH release from the perfused hypothalamus of the steroid primed rat. *Neuroendocrinology* 40: 497-500.
  - Leander J.D., Gesellghen P.D., Mendelsohn L.G. (1988). Opioid antinociceptive effects of delta receptor antagonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29: 351-355.
  - Lee N.M., Leybin L., Chang J.K., Loh H.H. (1980). Opiate and peptide interaction: Effect of enkephalins on morphine analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 68: 181-185.
  - Leibowitz S.F. (1985). Brain neurotransmitters and appetite regulation. *Psychopharmacol. Bull.* 21: 412-417.
  - Lemaire S., Magnan J., Regoli D. (1978). Rat vas deferens: a specific bioassay for endogenous opioid peptides. *Br. J. Pharmacol.* 64: 327-329.
  - Levine A.S., Grace M., Billington C.J., Portoghesi P.S. (1990). Nor-binaltorphimine decreases deprivation and opioid-induced feeding. *Brain. Res.* 534: 60-64.
  - Levine A.S., Morley J.E., Gosneli B.A., Billington C.J., Bartness R.J. (1985). Opioids and consummatory behavior. *Brain Res. Bull.* 14: 663-672.
  - Leventhal L., Cole J.L., Bodnar R.J. (1996). Reductions in locomotor activity following central opioid receptor subtype antagonists in rats. *Physiol. Behav.* 60 (3): 833-836.

- 
- Li C.H., Chung D. (1976). Isolation and structure of a untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73: 1145-1148.
  - Li S., Zhu J., Chen C., Chen Y.W., Deriel J.K., Ashby B., Liu-Chen L.Y. (1993). Molecular cloning and expression of a rat  $\kappa$  opioid receptor. *Biochem. J.* 295: 629-633.
  - Limonta P., Dondi D., Maggi R., Piva F. (1991). Testosterone and postnatal ontogenesis of hypothalamic  $\mu$  ( $[^3\text{H}]$ dihydromorphine) opioid receptors in the rat. *Dev. Brain Res.* 62: 131-136.
  - Lister R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* 92: 180-185.
  - Loh H.H., Liu H.C., Cavalli A., Yang W., Chen Y.F., Wei L.N. (1998).  $\mu$ -Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 54: 321-326.
  - Longoni R., Cadoni C., Mulas A., Di Chiara G., Spina L. (1998). Dopamine-dependent behavioural stimulation by non-peptide delta opioids BW373U86 and SNC 80: 2. Place-preference and brain microdialysis studies in rats. *Behav. Pharmacol.* 9(1): 9-14.
  - Longoni R., Spina L., Mulas A., Carboni E., Garau L., Melchiorri P., Di Chiara G. (1991). (D-Ala<sup>2</sup>)-deltorphin II: D1-dependent stereotypies and stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 11: 1565-1576.
  - Lord J.A.H., Waterfield A.A., Hughes J., Kosterlitz H.W. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-499.
  - Loughlin S.E., Massamiri T.R., Kornblum H.I., Leslie F.M. (1985). Postnatal development of opioid systems in rat brain. *Neuropeptides* 5: 469-472.
  - Lukaszewska I., Klepaczewska A. (1997). The effect of naloxone on object exploration, object recognition and other types of spontaneous behavior. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz)* 57(2): 123-133.
  - Madden J., Akil H., Patrick R.L., Barchas J.D. (1977). Stress-induced parallel changes in central opioid levels and pain responsiveness in the rat. *Nature* 265: 358-360.
  - Maggi A., Pérez J. (1995). Role of female gonadal hormones in the Central Nervous System: clinical and experimental aspect. *Life Sci.* 37: 906-917.
  - Magnan J., Paterson S.J., Tavani A., Kosterlitz H.W. (1982). The binding spectrum of narcotic analgesic drugs with different agonist and antagonist properties. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 319: 197-205.
  - Maldonado R., Daugé V., Feger J., Roques B.P. (1990). Chronic blockade of D<sub>2</sub> but not D<sub>1</sub> dopamine receptor facilitates behavioural responses to endogenous enkephalins, protected by kelatorphan, administered in the accumbens in rats. *Neuropharmacology* 29 (3): 215-223.
  - Malmberg A.B., Yaksh T.L. (1992). Isobolographic and dose-response analyses of the interaction between intratecal mu and delta agonists: effects of naltrindole and its benzofuran analog (NTB). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263: 264-275.
  - Mannelack D.T., Beart P.M., Gundlach A.L. (1986). Psychotomimetic  $\sigma$ -opiates and PCP. *Trends Pharmacol. Sci.* 7: 448-451.
  - Mansour A., Khachaturian H., Lewis M.E., Akil H., Watson S.J. (1987). Autoradiographic differentiation of  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci.* 7: 2445.
  - Mansour A., Khachaturian H., Lewis M.E., Akil H., Watson S.J. (1988). Anatomy of CNS opioid

- receptors. *Trends Neurosci.* 11: 308-314.
- Mansson E., Bare L., Yang D. (1994). Isolation of a human  $\kappa$  opioid receptor cDNA from placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 1431-1437.
  - Martin W.R., Wikler A., Eades C.G., Pescor F.T. (1963). Tolerance to and physical dependence on morphine in rats. *Psychopharmacology* 4: 247-260.
  - Martin W.R., Eades C.G., Thompson J.A., Huppler R.E., Gilbert P.E. (1976). The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197: 517-532.
  - Martin-Schild S., Zadina J.E., Gerall A.A., Vigh S., Kastin A.J. (1997). Localization of endomorphin-2-like immunoreactivity in the rat medulla and spinal cord. *Peptides* 18: 1641-1649.
  - Matthes H.W.D., Maldonado R., Simonin F., Valverde O., Slowe S., Kitchen I., Befort K., Dierich A., Le Meur M., Dollé P., Tzavara E., Hanoune J., Roques B.P., Kieffer B.L. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the  $\mu$ -opioid receptor gene. *Nature* 383: 819-823.
  - Matthes H.W.D., Smadja C., Valverde O., Vonesch J.L., Foutz A.S., Boudinot E., Denavit-Saubié M., Severini C., Negri L., Roques B.P., Maldonado R., Kieffer B.L. (1998). Activity of the  $\delta$  opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the  $\kappa$ -receptor is maintained in mice lacking the  $\mu$ -receptor. *J. Neurosci.* 18 (18): 7285-7295.
  - Mathiasen J.R., Vaught J.L. (1987). [D-Pen<sup>2</sup>, L-Pen<sup>5</sup>] enkephalin induced analgesia in the jimpy mouse: in vivo evidence for  $\delta$  receptor mediated analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 136: 405-407.
  - Mattia A., Farmer S.C., Takemori A.E., Sultana M., Portoghese P.S., Mosberg H.I., Bowen W.D., Porreca F. (1992). Spinal opioid delta antinociception in the mouse: mediation by a 5'-NTII-sensitive delta receptor subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 518-525.
  - McCormick C.M., Kehoe P., Kovacs S. (1998). Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: evidence of sensitization. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16(3-4): 175-185.
  - McDougall S.A., Garmsem G.M., Meier T.L., Crawford C.A. (1997). Kappa opioid mediated locomotor activity in the preweanling rat: role of pre- and postsynaptic dopamine receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 133(1): 62-68.
  - McDougall S.A., Rodarte-Freeman A.L., Nazarian A. (1999). Indirect dopamine agonists augment the locomotor activating effects of the kappa-opioid receptor agonists U-50,488 in preweanling rats. *Dev. Psychobiol.* 34(3): 183-193.
  - McDowell J., Kitchen I. (1986). Ontogenesis of  $\delta$ -opioid receptors in rat brain using [<sup>3</sup>H] [D-Pen<sup>2</sup> D-Pen<sup>5</sup>] enkephalin as a binding ligand. *Eur. J. Pharmacol.* 128: 287-289.
  - McDowell J., Kitchen I. (1987). Development of opioid systems: peptides, receptors and pharmacology. *Brain Res. Rev.* 12: 397-421.
  - McIntosh J., Anisman H., Merali Z. (1999). Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Dev. Brain. Res.* 12: 113(1-2): 97-106.
  - Mcknight A.T., Corbett A.D., Kosterlitz H.W. (1983). Increase in potencies of opioid peptides after peptidase inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 86: 393-402.
  - McLaughlin C.R., Tao Q., Abood M.E. (1995). Analysis of the antinociceptive actions of the  $\kappa$ -opioid

- receptor agonist enadoline (CI-977) in neonatal and adult rats: comparison to  $\kappa$ -opioid receptor mRNA ontogeny. *Drug Alcohol Depen.* 38: 261-269.
- McLaughlin P.J., Tobias S.W., Lang C.M., Zagon I.S. (1997). Opioid receptor blockade during prenatal life modifies postnatal behavioural development. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58(4): 1075-1082.
  - Meaney M.J., Aitken D.H., Bodnoff S.R., Iny L.J., Sapolsky R.M. (1985a). The effects of postnatal handling on the development of the glucocorticoid receptor systems and stress recovery in the rat. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 9: 731-734.
  - Meaney M.J., Aitken D.H., Bodnoff S.R., Iny L.J., Tatarewicz J.E., Sapolsky R.M. (1985b). Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behav. Neurosci.* 99: 765-770.
  - Meaney M.J., Aitken D.H., Sharma S., Viau V. (1992). Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type II and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 55 (2): 204-213.
  - Meaney M.J., Aitken D.H., Viau V., Sharma S., Samieau A. (1989). Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology* 50 (5): 597-604.
  - Meaney M.J., Stewart J., Beatty W.W. (1981). The effects of glucocorticoids during the neonatal period on the development of social play in juvenile rats. *Horm. Behav.* 16: 475-491.
  - Meaney M.J., Viau V., Bhatnagar S., Betito K., Iny L.J., O'Donnell D., Mitchell J.B. (1991). Cellular mechanisms underlying the development and expression of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 39(2): 265-274.
  - Melchiorri P., Maritati M., Negri L., Erspamer V. (1992). Long-term sensitization to the activation of cerebral delta-opioid receptors by [D-Ala<sup>2</sup>]-deltorphin II in rats exposed to morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3696-3700.
  - Meng F., Taylor L.P., Hoversten M.T., Ueda Y., Ardani A., Reinscheid R.K., Monsma F.J., Watson S.J., Civelli O., Akil H. (1996). Moving from the orphanin FQ receptor to an opioid receptor using four point mutations. *J. Biol. Chem.* 271: 32016-32020.
  - Meng F., Xie G.X., Thompson R., Mansour A., Goldstein A., Watson S., Akil H. (1993). Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9954-9958.
  - Meunier J.C., Mollereau C., Toll L., Suaudeau C., Moisand C., Alvinerie P., Butour J.L., Guillemot J.C., Ferrara P., Monsarrat B., Mazarguil H., Vassart G., Parmentier M., Costentin J. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL<sub>1</sub> receptor. *Nature (Lond.)* 377: 532-535.
  - Meyer M.E., Meyer M.E. (1993a). Behavioral effects of opioid peptide agonists DAMGO, DPDPE and DAKLI on locomotor activities. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45: 315-320.
  - Meyer M.E., Meyer M.E. (1993b). Behavioral effects of mu opioid agonists DAMGO, DALDA and PL017 on locomotor activities. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46: 391-395.
  - Meyer M.E., McLaurin B.I., Allen M., Meyer M.E. (1994). Biphasic effects of intraaccumbens mu-opioid peptide agonist DAMGO on locomotor activities. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47: 827-831.
  - Meyer M.E., McLaurin B.I., Meyer M.E. (1995a). DADLA (H-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) a potent mu-

- opioid peptide agonist, affects various patterns of locomotor activities. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51: 149-151.
- Meyer M.E., McLaurin B.I., Meyer M.E. (1995b). Intra-accumbens delta<sub>1</sub>-opioid agonist pCI-DPDPE, differentially affects patterns of locomotor activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51: 359-362.
  - Meyerson B.J., Berg M., Johansson B. (1988). Neonatal naltrexone treatment: effects on sexual and exploratory behavior in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31: 63-67.
  - Michael-Titus A., Doummap N., Constantin J. (1989). Mu and delta opioid receptors control differently the horizontal and vertical components of locomotor activity in mice. *Neuropeptides.* 13: 235-242.
  - Mickley G.A., Mulvihill M.A., Postler M.A. (1990). Brain  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors mediate different locomotor hyperactivity responses of the C57BL/6J mouse. *Psychopharmacology* 101: 332-337.
  - Millan M.J. (1986). Multiple opioid systems and pain. *Pain* 27: 303-347.
  - Millan M.J. (1989). Kappa-opioid receptor-mediated antinociception in the rat. I. Comparative actions of mu- and kappa- opioids against noxious thermal, pressure and electrical stimuli. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 334-341.
  - Millan M.J. (1990).  $\kappa$ -opioid receptors and analgesia. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:70-75
  - Millan M.J., Czlonkowski A., Lipkowski A., Herz A. (1989). Kappa-opioid receptor-mediated antinociception in the rat. II. Supraspinal in addition to spinal sites of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 342-350.
  - Millan M.J., Morris B.J. and Herz A. (1988). Antagonist-induced opioid receptor up-regulation. I. Characterization of supersensitivity to selective mu and kappa agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 721-728.
  - Millan M.J., Weihe E., Czlonkowski A.C. (1991). Endogenous opioid systems in the control of pain. En *Neurobiology of Opioids* (Editado por Almeida O.F.X., Shippenberg T.S.), pp. 246-260. Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg.
  - Minami M., Onogi T., Toya T., Katao Y., Hosoi Y., Maekawa K., Katsumata S., Yabuuchi K., Satoh M. (1994). Molecular cloning and in situ hybridization histochemistry for rat mu-opioid receptor. *Neurosci. Res.* 18: 315-322.
  - Minami M., Toya T., Katao Y., Maekawa K., Nakamura S., Onogi T., Kaneko S., Satoh M. (1993). Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. *FEBS Lett.* 329: 291-295.
  - Mizuno T., Kimura F. (1996). Medial septal injection of naloxone elevates acetylcholine release in the hippocampus and induces behavioral seizures in rats. *Brain Res.* 713: 1-7.
  - Mogil J.S., Belknap J.K. (1997). Sex and genotype determine the selective activation of neurochemically-distinct mechanism of swim stress-induced analgesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56: 61-66.
  - Molina N., Bedran-de-Castro M.T., Bedran-de-Castro J.C. (1994). Sex-related differences in the analgesic response to the rat tail immersion test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27(7): 1669-1672.
  - Montgomery K.C. (1958). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol.* 48: 254-260.
  - Montilla P., Muñoz J.L., Rios J.E., Muñoz M.C. (1989). Effect of oxytocin and naloxone on the plasma levels of corticosterone in the rat. *Rev. Esp. Fisiol.* 45(4): 319-322.

- Morelli M., Fenu S., Chiara G. (1989). Substantia nigra as a site of origin of dopamine-dependent motor syndroms induced by stimulation of mu and delta opioid receptors. *Brain. Res.* 487: 120-130.
- Morin-Surun M.P., Boudinot E., Gacel G., Champagnat J., Roques B.P., Denavit-Saubié M. (1984). Different effects of  $\mu$  and  $\delta$  opiate agonists on respiration. *Eur. J. Pharmacol.* 98: 235-240.
- Morley J.E. (1987). Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocr. Rev.* 8: 256-287.
- Morris B.J. (1991). Modulation of central opioid receptors. En *Neurobiology of Opioids* (Editado por Almeida O.F.X., Shippenberg T.S.), pp. 185-197. Springer-Verlag. Berlín Heidelberg, New York.
- Morris B.J., Millan M.J., Herz A. (1988). Antagonist-induced opioid receptor up-regulation, II. Regionally specific modulation of mu, delta and kappa binding sites in rat brain revealed by quantitative autoradiography. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 729-736.
- Motta V., Penha K., Brandao M.L. (1995). Effects of microinjections of  $\mu$  and  $\kappa$  receptor agonists into the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze test. *Psychopharmacology* (Berlin) 120: 470-474.
- Mucha R.F., Herz A. (1985). Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonists studied with place and taste preference conditioning procedures. *Psychopharmacology* 86: 274-280.
- Muhammad B.Y., Kitchen I. (1993a). A method for the study of swimming stress and stress-induced antinociception in preweanling rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 29: 139-141.
- Muhammad B.Y., Kitchen I. (1993b). Effect of delayed weaning on opioid receptor control of swim stress-induced antinociception in the developing rat. *Br. J. Pharmacol.* 109: 651-654.
- Murrin L.C., Coyle J.T., Kuhar M.J. (1980). Striatal opiate receptors: pre- and postsynaptic localization. *Life Sci.* 27: 1175-1183.
- Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A.C.Y., Cohen S.N., Numa S. (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* (Lond.) 278: 423-427.
- Nakazawa T., Furuya Y., Kaneko T., Yamatsu K. (1991). Spinal kappa receptor-mediated analgesia of E-2078, a systemically active dynorphin analog, in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256: 76-81.
- Naranjo J.R., Sánchez-Franco F., Garzón J., Del Río J. (1982). Analgesic activity of substance P in rats: apparent mediation by met-enkephalin release. *Life Sci.* 30:441-446.
- Narita M., Suzuki T., Funada M., Misawa M., Nagase H. (1993). Involvement of  $\delta$  opioid receptors in the effects of morphine on locomotor activity and the mesolimbic dopaminergic system in mice. *Psychopharmacology* 11: 423-426.
- Negri L., Falconieri Erspamer G., Severini C., Potenza R.L., Melchiorri P., Erspamer V. (1992). Dermorphin-related peptides from the skin of *Phyllomedusa bicolor* and their amidated analogs activate two  $\mu$  opioid receptor subtypes that modulate antinociception and catalepsy in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7203-7207.
- Negri L., Improta G., Lattanzi R., Potenza R.L., Luchetti F., Melchiorri P. (1995). Interaction between the mu-agonist dermorphin and the delta-agonist [D-Ala<sup>2</sup>,Glu<sup>4</sup>] deltorphin in supraspinal antinociception and delta-opioid receptor binding. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2931-2938.
- Negri L., Lattanzi R., Broccardo M., Melchiorri P. (1999). Knockdown of rat Brain  $\delta$ -opioid receptors by antisense oligodeoxynucleotides. *Dolor. Investigación, Clínica y Terapéutica.* 14 supl. 1. pp. 11.
- Negri L., Noviello L., Noviello V. (1996). Antinociceptive and behavioral effects of synthetic deltorphin

- analogs. *Eur. J. Pharmacol.* 296: 9-16.
- Negri L., Noviello L., Noviello V., Angelucci F. (1991). Behavioural effects of deltorphins in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 209: 163-168.
  - Ni Q., Xu H., Partilla J.S., De Costa B.R., Rice K.C., Kayakiri H., Rothman R.B. (1995). Opioid peptide receptor studies. 3. Interaction of opioid peptides and other drugs with four subtypes of kappa 2 receptor in guinea pig brain. *Peptides* 16: 1083-1095.
  - Nishi M., Takeshima H., Fukuda K., Kato S., Mori K. (1993). cDNA cloning and pharmacological characterization of an opioid receptor with high affinities for kappa-subtype selective ligands. *FEBS Lett.* 330: 77-80.
  - Noble F., Cox B.M. (1995). Differential regulation of D1 dopamine receptor- and A<sub>2a</sub> adenosine receptor-stimulated adenylyl cyclase by mu, delta 1 and delta 2 opioid agonists in rat caudate putamen. *J. Neurochem.* 65: 125-133.
  - Noble F., Soleilhac J.M., Soroca-Lucas E., Turcaud S., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P. (1992). Inhibition of the enkephalin-metabolizing enzymes by the first systemically active mixed inhibitor prodrug RB 101 induces potent analgesic responses in mice and rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261: 181-190.
  - Noble F., Smadja C., Valverde O., Maldonado R., Coric P., Turcaud S., Fournié-Zaluski M.C. Roques B.P. (1997). Pain-suppressive effects on various nociceptive stimuli (thermal, chemical, electrical and inflammatory) of the first orally active enkephalin-metabolizing enzyme inhibitor RB 120. *Pain* 73: 383-391.
  - Nock B., Giordano A.L., Cicero T.J., O'Connor L.H. (1990). Affinity of drugs and peptides for U-69,593-sensitive and insensitive Kappa opiate binding sites: the U-69,593 insensitive site appears to be the beta endorphin-specific epsilon receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254: 412-419.
  - Nock B., Giordano A.L., Moore B.W., Cicero T.J. (1993). Properties of the putative epsilon receptor-identification in rat, guinea-pig, cow, pig and chicken brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 349-359.
  - Nock B., Rajpara A., O'Connor L.H., Cicero T.J. (1988). Autoradiography of [3H]U-69593 binding sites in rat brain: evidence for  $\kappa$  opioid receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 154: 27-34.
  - Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S., Numa S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature (Lond.)* 295: 202-206.
  - Nuñez J.F., Ferre P., Escorihuela R.M., Tobena A., Fernández-Teruel A. (1996). Effects of postnatal handling of rats on emotional HPA-axis, and prolactin reactivity to novelty and conflict. *Physiol. Behav.* 60 (5): 1355-1359.
  - Nuñez J.F., Ferre P., García E., Escorihuela R.M., Fernández-Teruel A., Tobena A. (1995). Postnatal handling reduces emotionality ratings and accelerates two-way active avoidance in female rats. *Physiol. Behav.* 57 (7). 831-835.
  - Olmsted S.L., Takemori A.E., Portoghese P.S. (1993). A remarkable change of opioid receptor selectivity on the attachment of a peptidomimetic kappa address element to the delta antagonist, naltrindole: 5'-[N<sup>2</sup>-(alkylamidino)methyl] naltrindole derivatives as a novel class of kappa opioid receptor antagonists. *J. Med. Chem.* 36: 179-180.
  - Olton D.S., Johnson C.T., Howard E. (1974). Impairment of conditioned active avoidance in adult rats given corticosterone in infancy. *Dev. Psychobiol.* 8: 55-61.
  - O'Neill S.J., Collins M.A., Pettit H.O., McNutt R.W., Chang K.J. (1997). Antagonistic modulation

- between the delta opioid agonist BW373U86 and the mu opioid agonist fentanyl in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282(1): 271-277.
- Ostrowski N.L., Hatfield C.B., Caggiula A.R. (1982). The effects of low doses of morphine on the activity of dopamine-containing cells and on behavior. *Life Sci.* 31: 2347-2350.
  - Palazzi E., Ceppi E., Guglielmetti F., Catozzi L., Amoroso D., Groppetti A. (1996). Biochemical evidence of functional interaction between mu- and delta-opioid receptors in SK-N-BE neuroblastoma cell line. *J. Neurochem.* 67(1): 138-144
  - Pan Z.Z. (1998). Mu- opposing actions of the kappa opioid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 19(3): 94-98.
  - Papadouka V., Carr K.D. (1994). The role of multiple opioid receptors in the maintenance of stimulation-induced feeding. *Brain. Res.* 639: 42-48.
  - Pasternak G.W. (1980). Long-acting opiate agonists and antagonists: 14-Hydroxydihydromorphinone hydrazones. *J. Med. Chem.* 23: 674.
  - Pasternak G.W., Simantov R., Snyder S.H. (1976). Characterization of an endogenous morphine-like factor (enkephalin) in mammalian brain. *Mol. Pharmacol.* 12: 504-513.
  - Pasternak G.W., Wood P.J. (1986). Multiple mu opiate receptors. *Life Sci.* 38: 1889-1898.
  - Patia Spear L., File S.E. (1996). Methodological considerations in neurobehavioral teratology. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55(4): 455-457.
  - Paul D., Bodnar R.J., Gistrak M.A., Pasternak G.W. (1989). Different receptor subtypes mediate spinal and supraspinal analgesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 168: 307-314.
  - Pechnick R., George R., Poland R.E. (1985). Identification of multiple opiate receptors through neuroendocrine responses. I. Effects of agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232: 163-169.
  - Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods.* 14: 149-167.
  - Pellow S., File S. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects in exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 525-529.
  - Pelton J.T., Kzamiński W., Gulya K., Yamamura H.I., Hruby V.J. (1986). Design and synthesis of conformationally constrained somatostatin analogues with high potency and specificity for  $\mu$  opioid receptors. *J. Med. Chem.* 29: 2370-2375.
  - Pert C.B., Snyder S.H. (1973). Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science (Wash DC)* 179: 1011-1014.
  - Petrie B.F. (1993). Naltrexone does not increase brain and body development in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 15: 275-277.
  - Petrillo P., Tavani A., Verotta D., Robson L.E., Kosterlitz H.W. (1987). Differential postnatal development of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ - opioid binding sites in rat brain. *Dev. Brain. Res.* 31: 53-58.
  - Petrov E.S., Varlinskaya E.I., Becker L.A., Smotherman W.P. (1998). Endogenous mu opioid systems and suckling in the neonatal rat. *Physiol. Behav.* 1:65(3): 591-599.
  - Philopena J., Greenberg D., Smith G.P. (1996). Naloxone decreases intake of 10% sucrose in preweanling rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 333-337.

- 
- Piepponen T.P., Ahtee L. (1995). Effects of selective opioid receptor antagonists on morphine-induced changes in striatal and limbic dopamine metabolism. *Pharmacol. Toxicol.* 77(3): 204-208.
  - Pol O., Ferrer I., Puig M.M. (1994). Diarrhea associated with intestinal inflammation increases the potency of mu and delta opioids on the inhibition of gastrointestinal transit in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 386-391.
  - Pollard H., Llorens-Cortes C., Schwartz J.C. (1977). Enkephalin receptors on dopaminergic neurones in rat striatum. *Nature (Lond)*. 268:745-747.
  - Pollock J., Kornetsky C. (1996). Reexpression of mophine-induced oral stereotypy six months after last morphine sensitizing dose. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53: 67-71.
  - Porreca F., Heyman J.S., Mosberg H.I., Omnaas J.R., Vaught J.L. (1987b). Role of  $\mu$  and  $\delta$  receptors in the supraspinal and spinal analgesic effects of [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>] enkephalin in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 393-400.
  - Porreca F., Mosberg H.I., Hurst R., Hruba V.J., Burks T.F. (1984). Roles of mu, delta and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230: 341-348.
  - Porreca F., Mosberg H.I., Omnaas J.R., Burks T.F., Cowan A. (1987a). Supraspinal and spinal potency of selective opioid agonists in the mouse writhing test. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 890-894
  - Porreca F., Takemori A.E., Sultana M., Portoghese P.S., Bowen W.D., Mosberg H.I. (1992). Modulation of mu-mediated antinociception in the mouse involves opioid delta-2-receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263: 147-152.
  - Portoghese P.S. (1965). A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. *J. Med. Chem.* 8: 609-616.
  - Portoghese P.S., Larson D.L., Sayre L.M., Fries D.S., Takemori A.E. (1980). A novel opioid receptor site directed alkylating agent with irreversible narcotic antagonistic and reversible agonistic activities. *J. Med. Chem.* 23: 233-234.
  - Portoghese P.S., Lipkowsi A.W., Takemori A.E. (1987). Bimorphinans as highly selective potent kappa receptor antagonists. *J. Med. Chem.* 30: 238-239.
  - Portoghese P.S., Takemori A.E. (1985). TENA, a selective kappa opioid receptor antagonist. *Life Sci.* 36: 801-805.
  - Portoghese P.S., Sultana M., Takemori A.E. (1988). Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide  $\delta$  opioid receptor antagonist. *Eur.J. Pharmacol.* 146: 185-186.
  - Privette T.H., Terrian D.M. (1995). Kappa opioid agonists produce anxiolytic-like behavior on the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berlin)*. 118: 444-450.
  - Pujol A., De Cabo C., Martín M.I., Viveros M.P. (1993). A developmental study on stress-induced antinociception measured by the tail electric stimulation test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46: 373-376.
  - Quiron R. (1984). Pain, nociception and spinal cord opiate receptors. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 8: 571-579.
  - Raynor K., Kong H., Chen Y., Yasuda K., Yu L., Bell G., Reisine T. (1994). Pharmacological characterization of cloned kappa, delta and mu opioid receptors. *Mol. Pharmacol.* 45: 330-334.
  - Reid L.D. (1990). *Opioids, Bulimia and Alcohol Abuse and Alcoholism*, Springer-Verlag, New York,

pp. 1-393.

- Reid M., Herrera-Marschitz M., Hökfelt T., Terenius L., Ungerstedt U. (1988). Differential modulation of striatal dopamine release by intranigral injection of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), dynorphin A and substance P. *Eur. J. Pharmacol.* 147: 411-420.
- Reinscheid R.K., Nothacker H.P., Bourson A., Ardati A., Henningsen R.A., Bunzow J.R., Grandy D.K., Langen H., Monsma F.J. Jr., Civelli O. (1995). Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid like G protein-coupled receptor. *Science*. (Wash DC) 270: 792-794.
- Reisert I., Schuester R., Zienecker R., Pilgrim Ch. (1990). Prenatal development of mesencephalic and diencephalic dopaminergic systems in the male and female rat. *Dev. Brain. Res.* 53: 222.
- Reisert I., Engele H., Pilgrim Ch. (1989). Early sexual differentiation of diencephalic dopaminergic neurons of the rat in vitro. *Cell. Tissue Res.* 255: 411.
- Reisine T., Bell G.I. (1993). Molecular biology of opioid receptors. *Trends Neurosci.* 16: 506-510.
- Renda T., Negri L., Tooyama I., Casu C., Melchiorri P. (1993). Autoradiographic study on [ $^3$ H]-[D-Ala<sup>2</sup>]-deltorphin-I binding sites in the rat brain. *Neuroreport.* 4: 1143-1146.
- Richardson A., Demoliou-Mason C., Barnard E.A. (1992). Guanine nucleotide-binding protein-coupled and uncoupled states of opioid receptors and their relevance to the determination of subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10198-10202.
- Richter K., Egger R., Neri L., Corsi R., Sevrini C., Kreil G. (1990). cDNA encoding [D-ala<sup>2</sup>] deltorphin precursors from skin of *Phyllomedusa bicolor* also contain genetic information for three dermorphin-related opioid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4836-4839.
- Rimanóczy A., Vathy I. (1995). Prenatal exposure to morphine alters brain  $\mu$  opioid receptor characteristics in rats. *Brain Res.* 690: 245-248.
- Robbins T.W. (1977). En *Handbook of Psychopharmacology* (Editado por Iversen L.L., Iversen S.D., Snyder S.H.), vol. 7, pp. 37-82. Plenum, New York.
- Robinson S.R., Hoeltzel T.C., Smotherman W.P. (1995). Development of responses to an artificial nipple in the rat fetus: Involvement of responses of mu and kappa opioid systems. *Physiol. Behav.* 57: 953-957.
- Rodgers R.J., Deacon R.M.J. (1979). Effect of naloxone on the behaviour of rats exposed to a novel environment. *Psychopharmacology* 65: 103-105.
- Römer D., Büscher H., Hill R.C., Maurer R., Petcher R.J., Welle H.B.A., Bakel C.C.K., Adderman A.M. (1980). Bremazocine: a potent, long-acting opiate kappa-agonist. *Life Sci.* 27: 971-978.
- Römer D., Büscher H.H., Hill R.C., Maurer R., Petcher T.J., Zeugner H., Benson W., Finner E., Milkowski W., Thies P.W. (1982). An opioid benzodiazepine. *Nature*. (Lond.) 298: 759-760.
- Romero M.T., Cooper M.L., Komisaruk B.R., Bodnar R.J. (1988). Gender-specific and gonadectomy-specific effects upon swim analgesia: role of steroid replacement therapy. *Physiol. Behav.* 44: 257-265.
- Romero J., De Miguel R., García-Palomero E., Fernández-Ruiz J.J., Ramos J.A. (1995b). Time-course of the effects of anandamide, the putative endogenous cannabinoid receptor ligand, on extrapyramidal function. *Brain Res.* 694: 223-232.
- Romero J., García L., Cebeira M., Zadrozny D., Fernández-Ruiz J.J., Ramos J.A. (1995a). The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of

nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci.* 56: 2033-2040.

- Ronken E., Van Muiswinkel F.L., Mulder A.H., Schoffelmeer A.N. (1993). Opioid receptor-mediated inhibition of evoked catecholamine release from cultured neurons of rat ventral mesencephalon and locus coeruleus. *Eur. J. Pharmacol.* 230:349-355.
- Rosecrans J.A., Elchisak M.A., Harry G.J. (1977). Morphine and methadone-induced antinociception in rats permanently depleted of brain dopamine. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 229: 287-300.
- Rossi G.C., Brown G.P., Leventhal L., Yang K., Pasternak G.W. (1996). Novel receptor mechanisms for heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia. *Neurosci. Lett.* 216: 1-4.
- Roth B.L., Galloway M.P., Coscia C.J. (1980). The effects of morphine on catecholamine metabolism during postnatal development. *Brain Res.* 197: 561-564.
- Rothman R.B., Bykov V., De Costa B.R., Jacobson A.E., Rice K.C., Brady L.S. (1990). Interaction of endogenous opioid peptides and other drugs with four kappa opioid binding sites in guinea pig brain. *Peptides* 11:311-331.
- Rothman R.B., Bykov V., Jacobson A.E., Rice D.K.C., Long J.B., Bowen W.D. (1992). A study of the effect of the irreversible delta receptor antagonist [D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Cys<sup>6</sup>]-enkephalin on  $\delta_{cx}$  and  $\delta_{ncx}$  opioid binding sites in vitro and in vivo. *Peptides* 13: 691-694.
- Rothman R.B., Bykov V., Long J.B., Brady L.S., Jacobson A.E., Rice K.C., Holaday J.W. (1989). Chronic administration of morphine and naltrexone up-regulate  $\mu$  opioid binding sites labeled by [<sup>3</sup>H] [D-Ala<sup>2</sup>, MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>] enkephalin: further evidence for two  $\mu$ -binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 160: 71-82.
- Rothman R.B., Holaday J.W., Porreca F. (1993). Allosteric coupling among opioid receptor: evidence for an opioid receptor complex. En *Handbook of Experimental Pharmacology* (Editado por Herz A.), Opioids I. Vol. 104, pp. 217-237. Springer, New York.
- Rothman R.B., Jacobson K.C., Rice M.M., Herkenham (1987). Autoradiographic evidence for two classes of  $\mu$  opioid binding sites in rat brain using [<sup>125</sup>I] FK33824. *Peptides* 8: 1015.
- Rothman R.B., Long J.B., Bykov V., Jacobson A.E., Rice K.C., Holaday J.W. (1988).  $\beta$ -FNA binds irreversibly to the opiate receptor complex: *in vivo* and *in vitro* evidence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 405-416.
- Rothman R.B., Schumacher U.K., Pert C.B. (1984). Effect of  $\beta$  FNA on opiate  $\delta$  receptor binding. *J. Neurochem.* 43: 1197-1200.
- Rothman R.B., Westfall T.C. (1982a). Morphine allosterically modulates the binding of [<sup>3</sup>H]leucine to a particulate fraction of rat brain. *Mol. Pharmacol.* 21: 538-547.
- Rothman R.B., Westfall T.C. (1982b). Allosteric coupling between morphine and enkephalin receptors *in vitro*. *Mol. Pharmacol.* 21: 548-577.
- Roy S., Liu H.C., Loh H.H. (1998).  $\mu$ -Opioid receptor-knockout mice: the role of mu-opioid receptor in gastrointestinal transit. *Mol. Brain Res.* 56: 281-283.
- Sanger D.J. (1981). Endorphinergic mechanisms in the control of food and water intake. *Appetite* 2: 193-208.
- Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S. (1984). The role of hippocampal corticosterone receptor in terminating the adrenocortical stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 6174-6177.

- 
- Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S. (1985). Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implication for aging. *J. Neurosci.* 5: 1222-1227.
  - Sapolsky R.M., Meaney M.J. (1986). The maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res. Rev.* 11: 65-76.
  - Satoh M., Minami M. (1995). Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol. Ther.* 68: 343-364.
  - Schapiro S. (1968). Maturation of the neuroendocrine response to stress in the rat. En *Early Experience and Behavior* (Editado por Newton G., Levine S.). Thomas, Springfield IL.
  - Schapiro S. (1971). Hormonal and environmental influences on rat brain and behavior. En *Brain Development and Behavior* (Editado por Sterman y McGinty), pp. 307-334. Academic Press, New York.
  - Schiller P.W., Nguyen T.M.D., Weltrowska G., Wilkes B.C., Marsden B.J., Lemieux C., Chung N.N. (1992). Differential stereochemical requirements of  $\mu$  vs  $\delta$  opioid receptors for ligand binding and signal transduction: development of a class of potent and highly  $\delta$  selective peptide antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11871-11875.
  - Schmajuk N.A. (1984). Psychological theories of hippocampal function. *Physiol. Psychol.* 12: 166-183.
  - Schmauss C. (1987). Spinal  $\kappa$ -opioid receptor-mediated antinociception is stimulus specific. *Eur. J. Pharmacol.* 137: 197-205.
  - Schmauss C., Yaksh T.L. (1984). In vivo studies on spinal opiate receptor systems mediating antinociception. II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta and kappa receptors with visceral and cutaneous thermal stimuli in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228: 1-11.
  - Schreff M., Schulz S., Wiborny D., Holtt V. (1998). Immunofluorescent identification of endomorphin-2-containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord. *Neuroreport.* 9: 1031-1034.
  - Schuller A.G.P., King M.P., Zhang J.Z., Czick M., Unterwald E., Pasternak G.W., Pintar J.E. (1997). Heroin and M6G analgesia are retained in mu opioid receptor deficient mice. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23: 584.
  - Schulz R., Wuster M., Herz A. (1979). Supersensitivity to opioids following chronic blockade of endorphin action by naloxone. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 306: 93-96.
  - Schulz R., Wuster M., Herz A. (1981). Pharmacological characterization of the  $\epsilon$  opiate receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216: 604-606.
  - Sewell R.D.E. (1980). Naloxone antagonism of suckling behaviour in newborn rats suggests a possible endorphin modulation. *IRCS Med. Sci.* 8: 224-227.
  - Shalev U., Feldon J., Weiner I. (1998). Gender and age dependent differences in latent inhibition following preweaning non handling: implications for a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Int. H. Dev. Neurosci.* 16 (3-4): 279-288.
  - Sharma T.R., Chan W.C., Gintzler A.R. (1988). Effect of chronic naltrexone administration and its withdrawal on the regional activity of neurons that contain norepineprine, dopamine and serotonin. *Brain Res.* 442: 379-386.
  - Shaw J.S., Miller L., Turnbull M.J., Gormley J.J., Morley J.S. (1982). Selective antagonist at the

opiate delta-receptors. *Life Sci.* 31: 1259-1262.

- Sheldon R.J., Nunan L., Porreca F. (1989). Differential modulation by [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]-enkephalin and dynorphin A-(1-17) of the inhibitory bladder motility effects of selected  $\mu$  agonists *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249: 462-469.
- Shook J.E., Kazmierski W., Wire W.S., Lemcke P.K., Hruby V.J., Burks T.F. (1988). Opioid receptor selectivity of  $\beta$ -endorphin in vitro and in vivo  $\mu$ , delta and epsilon receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 1018-1025.
- Siddiqui A., Gilmore D.P. (1988). Regional differences in the catecholamine content of the rat brain: effects of neonatal castration and androgenization. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 118(4): 483-494.
- Siddiqui A., Shah B.H. (1997). Neonatal androgen manipulation differentially affects the development of monoamine systems in rat cerebral cortex, amygdala and hypothalamus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 98(2): 247-252.
- Siegel R.A., Chowers I., Conforti N., Felman S., Weidenfeld J. (1982). Effects of naloxone on basal and stress-induced ACTH and corticosterone secretion in male rat-site and mechanism of action. *Brain Res.* 249:103-109.
- Simon E.J., Hiller J.M., Edelman I. (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [<sup>3</sup>H] etorphine to rat brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70: 1947-1949.
- Simon H., LeMoal M. (1984). Mesencephalic dopaminergic neurons: functional role. En *Catecholamines: Neuropharmacology and central nervous system* (Editado por Usdin E., Carlson A., Dahlström A., Engel J.), pp. 293-307. Theoretical aspects, New York, Liss.
- Simonin F., Valverde O., Smadja C., Slowe S., Kitchen I., Dierich A., Le Meur M., Roques B.P., Maldonado R., Kieffer B.L. (1998). Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U50,488 H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J.* 17(4): 886-897.
- Sirinathsinghji D.J.S., Motta M., Martini L. (1985). Induction of precocious puberty in the female rat after chronic naloxone administration during the neonatal period: the opiate "brade" on prepubertal gonadotropin secretion. *J. Endocr.* 104: 299-307.
- Slowe S.J., Simonin F., Kieffer B., Kitchen I. (1999). Quantitative autoradiography of  $\mu$ -, delta- and kappa 1 opioid receptors in kappa-opioid receptor knockout mice. *Brain Res.* 818(2): 335-345.
- Smythe J.W., McCormick C.M., Rochford J., Meaney M.J. (1994). The interaction between prenatal stress and neonatal handling on nociceptive response latencies in male and females rats. *Physiol. Behav.* 55(5): 971-974.
- Smythe J.W., McCormick C.M., Meaney M.J. (1996). Median eminence corticotropin-releasing hormone content following prenatal stress and neonatal handling. *Brain Res. Bull.* 40(3): 195-199.
- Sofuoglu M., Portoghese P.S., Takemori A.E. (1991). Differential antagonism of delta opioid agonists by naltrindole and its benzofuran analog (NTB) in mice: evidence for delta opioid receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 676-680.
- Sofuoglu M., Portoghese P.S., Takemori A.E. (1993). 7 Benzylidene-naltrexone (BNTX): a selective  $\delta_1$  opioid receptor antagonist in the mouse spinal cord. *Life Sci.* 52: 769-775.
- Sora I., Funada M., Uhl G.R. (1997a). The  $\mu$  opioid receptor is necessary for [D-Pen 2, D-Pen 5] enkephalin-induced analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 324: R1-R2.
- Sora I., Takahashi N., Funada M., Ujike H., Revay R.S., Donovan D.M., Miner L.L., Uhl G.R. (1997b).

- Opiate receptor knockout mice define  $\mu$  receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1544-1549.
- Spain J.W., Roth B.L., Coscia C.J. (1985). Differential ontogeny of multiple opioid receptors ( $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$ ). *J. Neurosci.* 5: 584-588
  - Spanagel R., Almeida O.F.X., Shippengerg T.S. (1994). Evidence that nor-binaltorphimine can function as an antagonist at multiple opioid receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 264: 157-162.
  - Spina L., Longoni R., Mulas A., Chang K.J., Di Chiara G. (1998). Dopamine-dependent behavioural stimulation by non-peptide delta opioids BW373U86 and SNC 80: 1. Locomotion, rearing and stereotypies in intact rats. *Behav. Pharmacol.* 9(1): 1-8.
  - Stapelfeld A., Hammond D.L., Rafferty M.F. (1992). Antinociception after intra-cerebroventricular administration of naltrindole in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 214: 273-276.
  - Steece K.A., Deleon-Jones F.A., Lee J.M., Ritzmann R.F. (1986). The effect of chronic met-enk on various dopamine systems in the rat. *Progress in Opioid Research Proceedings of the 1986 International Narcotics Research Conference. NIDA. Research Monograph 75:* 583-586.
  - Steenbergen H.L., Farabollini F., Heinsbroek R.P.W., Van de Poll N.E. (1991). Sex-dependent effects of aversive stimulation on hole board and elevated plus-maze behavior. *Behav. Brain. Res.* 43: 159-165.
  - Steimer T., Escorihuela M., Fernández-Terel A., Driscoll P. (1998). Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman high- (RHA/Verh) and low- (RLA-Verh) avoidance rats following neonatal handling. *J. Dev. Neurosci.* 16 (3-4): 165-174.
  - Stein C. (1993). Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth. Analg.* 76: 182-191.
  - Stewart P.E., Hammond D.L. (1993). Evidence for delta opioid receptor subtypes in rat spinal cord: studies with intrathecal naltriben, cyclic [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>] enkephalin and [D-Ala<sup>2</sup>, Glu<sup>4</sup>] deltorphin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 820-828.
  - Stone E.A. (1975). Stress and catecholamines. En *Catecholamines and Behavior* (Editado por Friedhoff A.J.), Vol. 2, pp. 31-72. New York, Plenum Press.
  - Stone E.A. (1978). Possible grooming deficit in stressed rats. *Res. Com. Psychol. Psychiat. Behav.* 3(2): 109-115.
  - Su Y.F., McNutt R.W., Chang K.J. (1998). Delta opioid ligands reverse alfentanil-induced respiratory depression but not antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287(3): 815-823.
  - Sullivan A.F., Dickenson A.H., Roques B.P. (1989).  $\delta$ -opioid mediated inhibitions of acute and prolonged noxious-evoked responses in rat dorsal horn neurones. *Br. J. Pharmacol.* 98: 1039-1049.
  - Sunal R. (1986). Influence of naloxone on H<sub>2</sub>-receptor blocker drugs effects in the "behavioral despair" test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25: 511-513.
  - Suzuki T., Tsuji M., Mori T., Misawa M., Nagase H. (1995a). Effect of naltrindole on the development of physical dependence on morphine in mice: a behavioral and biochemical study. *Life Sci.* 57: PL247-252.
  - Suzuki T., Tsuji M., Mori T., Misawa A., Endoh T., Nagase H. (1995b). Effects of a highly selective nonpeptide delta opioid receptor agonist, TAN 67, on morphine-induced antinociception in mice. *Life Sci.* 57(2). 155-168.
  - Suzuki T., Tsuji M., Mori T., Misawa M., Nagase H. (1996). The effects of dopamine D1 and D2 receptor antagonists on the rewarding effects of delta 1 and delta 2 opioid receptor agonists in

- mice. *Psychopharmacology (Berl)* 124:211-218.
- Svingos A.L., Clarke C.L., Pickel V.M. (1999). Localization of the delta-opioid receptor and dopamine transporter in the nucleus accumbens shell: Implications for opiate and psychostimulant cross-sensitization. *Synapse* 34:1-10.
  - Swerdlow N.R., Amalric M., Doob G.F. (1987). Nucleus accumbens opiate-dopamine interactions and locomotor activation in the rat: evidence for a presynaptic locus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26: 765-769.
  - Szekely J.I., Miglecz E., Ronai A.Z. (1980). Biphasic effects of a potent enkephalin analogue (K-Met<sup>2</sup>,Pro<sup>5</sup>)-enkephalinamide and morphine on locomotor activity in mice. *Psychopharmacology (Berlin)* 72:299-301.
  - Szekely J.I., Ronai A.Z. (1982a). *Opioid peptides, vol.1. Research methods*. CRC, Boca Raton.
  - Szekely J.I., Ronai A.Z. (1982b). *Opioid peptides, vol.2. Pharmacology*. CRC, Boca Raton.
  - Takemori A.E., Portoghese P.S. (1992). Selective naltrexone-derived opioid receptor antagonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 239-269.
  - Takemori A.E., Sultana M., Nagase H., Portoghese P.S. (1992). Agonist and antagonists activities of ligands derived from naltrexone and oxymorphone. *Life Sci.* 50: 1491-1495.
  - Tanaka M., Kohno Y., Nakagawa Y., Ida K., Iimori K., Hoaki Y., Tsuda A., Nagasaki N. (1981). Enhancement of stress-induced increases in hypothalamic noradrenaline turnover by pretreatment with naloxone in rats. *Kurume Med.* 28: 241-246.
  - Tanaka M., Kohno Y., Nakagawa Y., Ida K., Iimori K., Hoaki Y., Tsuda A., Nagasaki N. (1982). Naloxone enhances stress-induced increases in noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. *Life Sci.* 30: 1663-1669.
  - Tang H., Collins R.J. (1978). Enhanced analgesic effects of morphine after chronic administration of naloxone. *Eur. J. Pharmacol.* 47: 473-474.
  - Tang T., Kiang J.G., Cox B.M. (1994). Opioids acting through delta receptors elicit a transient increase in the intracellular free calcium concentration in dorsal root ganglion-neuroblastoma hybrid ND8-47 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 40-46.
  - Tao P.L., Han K.F., Wang S.D., Lue W.M., Elde R., Law P.Y., Loh H.H. (1998). Immunohistochemical evidence of down-regulation of mu-opioid receptor after chronic PL-017 in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 344(2-3): 37-142.
  - Tao P.L., Lee H.Y., Chang L.R., Loh H.H. (1990). Decrease in mu opioid binding capacity in rat brain after chronic PL-017 treatment. *Brain Res.* 526: 270-275.
  - Tapp W.N., Mittler J.C., Natelson B.H. (1981). Effects of naloxone on corticosterone response to stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 14: 749.
  - Tempel A., Gardner E.L., Zukin R.S. (1984). Visualization of opiate receptor upregulation by light micro, copy autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 3893-3897.
  - Tempel A., Gardner E.L., Zukin R.S. (1985). Neurochemical and functional correlates of naltrexone-induced opiate receptor up-regulation. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 232: 439-444.
  - Tempel A., Habas J.E., Paredes W., Barr G.A. (1988). Morphine-induced downregulation of  $\mu$ -opioid receptors in neonatal rat brain. *Dev. Brain. Res.* 41: 129-133.

- 
- Tempel A., Zukin R.S., Gardner L. (1982). Supersensitivity of brain opiate receptor subtypes after chronic naltrexone treatment. *Life Sci.* 31: 1401-1404.
  - Terenius L. (1973). Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 32: 317-329.
  - Thompson R.C., Mansour A., Akil H., Watson S.J. (1993). Cloning and pharmacological characterization of a rat  $\mu$  opioid receptor. *Neuron.* 11: 903-913.
  - Tian M., Broxmeyer H.E., Fan Y., Lai Z., Zhang S., Aronica S., Cooper S., Bigsby R.M., Steinmetz R., Engle S.J., Mestek A., Pollock J.D., Lehman M.N., Jansen H.T., Ying M., Stambrook P.J., Tischfield J.A., Yu L. (1997). Altered hematopoiesis, behavior, and sexual function in mu opioid receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 185: 1517-1522.
  - Traynor J.R., Elliot J. (1993).  $\delta$ -opioid receptor subtypes and cross-talk with  $\mu$ -receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 84-86.
  - Trentini G.P., Gennazani A.R., De Gaetani C., Petraglia F., Criscuolo M., Ficarra G., Bikzinska B. (1991). The circadian rhythm in hypothalamic  $\beta$ -endorphin content: its putative role in daily changes in stress response. En *Stress and related disorders, from adaptation to dysfunction* (Editado por Genazzani A.R., Nappi G., Petraglia F., Martignoni E.), pp. 113-120. The Parthenon Publishing Group, New Jersey.
  - Tyers M.B. (1980). A classification of opiate receptors that mediate antinociception in animals. *Br. J. Pharmacol.* 69: 503-512.
  - Udenfriend S., Kilpatrick L. (1984). Proenkephalin and the products of its processing: chemistry and biology. En *The Peptides* (Editado por Udenfriend S., Meienhofer S.), pp. 26-28. Academic Press, London.
  - Ukai M., Holtzman S.G. (1988). Effects of beta-funaltrexamine on ingestive behaviors in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 153: 161-165.
  - Ukai M., Kobayashi T., Shinkai N., Shan-Wu X., Kameyama T. (1995). Dynorphin A (1-13) potently improves scopolamine-induced impairment of passive avoidance response in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 274: 89-93.
  - Vallee M., Mayo W., Dellu F., Le Moal M., Simon H., Maccari S. (1997). Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci.* 17(7): 2626-2636.
  - Valverde O., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P., Maldonado R. (1996). Similar involvement of several brain areas in the antinociception of endogenous and exogenous opioids. *Eur. J. Pharmacol.* 312: 15-25.
  - Van Abeelen J.H.F. (1989). Genetic control of hippocampal cholinergic and dynorphinergic mechanisms regulating novelty-induced exploratory behavior in house mice. *Experientia* 47: 839-845.
  - Van Bockstaele E.J., Commons K., Pickel V.M. (1997). Delta-opioid receptor is present in presynaptic axon terminals in the rat nucleus locus coeruleus: relationships with methionine 5-enkephalin. *J. Comp. Neurol.* 388:575-586.
  - VanderWende C., Spoerlein M.T., Can Luc N. (1975). Studies on the role of dopaminergic systems in morphine-induced motor activity. Comparison with noradrenergic and cholinergic systems. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 11(1): 79-88
  - Vaught J.L., Rothman R.B., Westfall T.C. (1982). Mu and delta receptors: Their role in analgesia and

- in the differential effects of opioid peptides on analgesia. *Life Sci.* 30: 1443-1455.
- Vaught J.L., Takemori A.E. (1979). Differential effects of leucine and methionine enkephalin on morphine-induced analgesia, acute tolerance and dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208: 86-90.
  - Vermeulen R.J., Drukarch B., Sahadat M.C., Goosen C., Schoffemeer A.N., Wolters E.C., Stoof J.C. (1995). Morphine and naltrexone modulate D<sub>2</sub> but not D<sub>1</sub> receptor induced behavior in MPTP-lesioned monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 118(4): 451-459.
  - Viveros M.P., Pujol A., De Cabo C., Martín M.I. (1993). A study on the development of nociceptive responses in pre- and postweaning rats: the tail electric stimulation test as a suitable methodology. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 15(1): 31-33.
  - Viveros M.P., De Cabo C., Colado M.I., Martín M.I. (1995). Naltrexone administration during the preweaning period affects striatal and hypothalamic serotonergic systems, but not midbrain serotonergic or striatal dopaminergic systems in the adult rat. *Neurosci. Lett.* 201: 195-198.
  - Viveros M.P., Hernández R., Martínez I., González P. (1988). Effects of social isolation and crowding upon adrenocortical reactivity and behavior in the rat. *Rev. Esp. Fisiol.* 44: 315-322.
  - Viveros M.P., Fernández B., Antelo M.T., Alfaro M.J., Martín M.I. (1997). Influence of manipulation and  $\delta$  opioid receptor blockade on nociceptive and behavioural responses in the neonatal rat. *J. Physiol. Biochem.* 53 (1): 104.
  - Viveros M.P., Martín S., Ormazabal M.J., Alfaro M.J., Martín M.I. (1996). Effects of nimodipine and nifedipine upon behavior and regional brain monoamines in the rat. *Psychopharmacology* 127: 123-132.
  - Volpicelli J.R., O'Brien C.P., Alterman A.I., Hayashida M. (1990). Naltrexone and the treatment of alcohol-dependence: Initial observations. En *Opioids, Bulimia and Alcohol Abuse and Alcoholism* (Editado por Reid L.R.), pp. 195-214. Springer-Verlag, New York.
  - Volterra A., Brunello N., Cagiano R., Cuomo V., Racagni G. (1984). Behavioural and biochemical effects in C57BL/6J mice after a prolonged treatment with the  $\delta$ -opiate antagonist ICI 154129. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 849-851.
  - Von Voigtlander P.F., Lahti R.A., Ludens J.H. (1983). U-50,488H, a selective and structurally novel non-mu ( $\kappa$ ) opioid agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224: 7-12.
  - Von Voigtlander P.F., Lewis R.A. (1988). Analgesic and mechanistic evaluation of spiradoline, a potent kappa opioid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 259-262.
  - Waddell A.B., Holtzman S.G. (1998). Modulation of cocaine-induced motor activity in the rat by opioid receptor agonists. *Behav Pharmacol.* 9:397-407.
  - Waksman G., Hamel E., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P. (1986). Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of mu and delta opioid receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1523-1527.
  - Walker C.D., Aubert M.L. (1988). Effects of early undernutrition and handling on the adrenocortical activity of neonatal rats. *Life Sci.* 43(24): 1983-1990.
  - Walker C.D., Perrin M., Vale W., Rivier C. (1986). Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology* 118: 1445-1451.
  - Wang J.B., Imia Y., Eppler C.M., Gregor P., Spivak C.E., Uhl G.R. (1993).  $\mu$  Opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10230-10234.

- 
- Wang J.B., Johnson P.S., Persico A.M., Hawkins A.L., Griffin C.A., Uhl G.R. (1994). Human  $\mu$  opiate receptor: cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett.* 338: 217-222.
  - Ward S.J., Fries D.S., Larson D.L., Portoghese P.S., Takemori A.E. (1985). Opioid receptor binding characteristics of the non-equilibrium mu antagonist, beta-funaltrexamine (beta-FNA). *Eur. J. Pharmacol.* 107: 323-330.
  - Watson S.J., Akil H., Khachaturian H., Young E., Lewis M.E. (1984). Opioid systems: anatomical, physiological and clinical perspectives. En *Opioids: past, present and future* (Editado por Hughes J., Collier H.O.J., Rance M.J.), pp. 145-178. Taylor & Frances, London.
  - Weichsel M. (1974). Glucocorticoid effect upon thymidine kinase in the developing cerebellum. *Pediatr. Res.* 8: 843-847.
  - Weisz J., Ward I.L. (1980). Plasma testosterone and progesterone litters of pregnant rats, their male and female fetuses and neonatal offspring. *Endocrinology* 106: 306.
  - Wennemer H.K., Kornetsky C. (1996). Fluoxetine blocks the expression but not the development of morphine-induced sensitization of oral stereotypy in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22: 173.
  - Wier P.J., Guerriero F.G., Walker R.F. (1989). Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fund. App. Toxicol.* 13: 118-136.
  - Wild K.D., Carlisi V.J., Mosberg H.I., Bowen W.D., Portoghese P.S., Sultana M., Takemori A.E., Hruby V.J., Porreca F. (1993). Evidence for a single functional opioid delta receptor subtype in the mouse isolated vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 831-838.
  - Wild K.D., Vanderah T., Mosberg H.I., Porreca F. (1991). Opioid delta receptor subtypes are associated with different postassium channels. *Eur. J. Pharmacol.* 193: 135-136.
  - Wilkes M.M., Yen S.S.C. (1980). Reduction by  $\beta$ -endorphin of the efflux of dopamine and DOPAC from superfused medial basal hypothalamus. *Life Sci.* 27: 1387-1391.
  - Wilson C.A., González I., Farabollini F. (1991). Behavioral effects in adulthood of neonatal manipulation of brain serotonin levels in normal and androgenized females. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41: 91-98.
  - Winsky L., Holmes P.V. (1995). Effects of morphine on behavioral activity elicited by intermittent tones. Coincident changes in phospho-creb immunoreactivity in the reticular formation and brainstem of rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21: 730.
  - Wüster M., Rubini P., Schulz R. (1981). The preference of putative pro-enkephalins for different types of opioid receptor. *Life Sci.* 29: 1219-1227.
  - Wüster M., Schulz R., Herz A. (1979). Specificity of opioids towards the  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\epsilon$ -opiate receptors. *Neurosci. Lett.* 15: 193-198.
  - Xie G.X., Meng F., Mansour A., Thompson R.C., Hoversten M.T., Goldstein A., Watson S.J., Akil H. (1994). Primary structure and functional expression of a guinea pig  $\kappa$  opioid (dynorphin) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3779-3783.
  - Yaksh T.L., Tyce G.M. (1979). Microinjection of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from the spinal cord. *Brain Res.* 171: 176-181.
  - Yasuda K., Raynor K., Kong H., Breder C.D., Takeda J., Reisine T., Bell G.I. (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6736-6740.

- 
- Yilmaz B., Gilmore D.P.(1999). Effects of mu, kappa, and delta opioid receptor agonists and antagonists on rat hypothalamic noradrenergic neurotransmission. *Brain Res. Bull.* 48:491-495.
  - Yoburn B.C., Goodman R.R., Cohen A.H., Pasternak G.W., Inturrisi C.E. (1985). Increased analgesic potency of morphine and increased brain opioid binding sites in the rat following chronic naltrexone treatment. *Life Sci.* 36: 2325-2332.
  - Yoburn B.C., Luke M.C., Pasternak G.W., Inturrisi C.E. (1988). Up regulation of opioid receptor subtypes correlates with potency changes of morphine and DADLE. *Life Sci.* 43: 1319-1324.
  - Yoburn B.C., Nunes F.C., Adler B., Pasternak G.W., Inturrisi C.E. (1986). Pharmacodynamic supersensitivity and opioid receptor upregulation in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239: 132-135.
  - Yoburn B.C., Paul D., Azimuddin S., Lutfy K., Sierra V. (1989a). Chronic opioid antagonist treatment increases  $\mu$  and  $\delta$  receptor mediated spinal opioid analgesia. *Brain Res.* 485: 176-178.
  - Yoburn B.C., Sierra V., Lutfy K. (1989b). Chronic opioid antagonist treatment: Assessment of receptor upregulation. *Eur. J. Pharmacol.* 170: 193-200.
  - Yoburn B.C., Sierra V., Lutfy K. (1990). Simultaneous development of opioid tolerance and opioid antagonist-induced receptor upregulation. *Brain Res.* 529: 143-148.
  - Zadina J.E., Hackler L., Ge L.J., Kastin A.J. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386: 499-502.
  - Zadina J.E., Kastin A.J. (1986). Neonatal peptides affect developing rats:  $\beta$ -endorphin alters nociception and opiate receptors, corticotropin-releasing factor alters corticosterone. *Dev. Brain Res.* 29: 21-29.
  - Zadina J.E., Kastin A.J., Coy D.H., Adinoff B.A. (1985). Developmental, behavioral, and opiate receptor changes after prenatal or postnatal  $\beta$ -endorphin, CRF, or Tyr-MIF-1. *Psychoneuroendocrinology* 10: 367-383.
  - Zagon I.S., Gibo D.M., McLaughlin P.J. (1991). Zeta ( $\zeta$ ), a growth-related opioid receptor in developing rat cerebellum: identification and characterization. *Brain Res.* 551: 28-35.
  - Zagon I.S., McLaughlin P.J. (1984). Naltrexone modulates body and brain development in rats: a role for endogenous opioid systems in growth. *Life Sci.* 35: 2057-2064.
  - Zagon I.S., McLaughlin P.J. (1985). Naltrexone's influence on neurobehavioral development. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22: 441-448.
  - Zagon I.S., McLaughlin P.J. (1990). Drugs of abuse and the fetus and neonate: testing and evaluation in animals. En *Modern Methods in Pharmacology* 6: 241-254.
  - Zagon I.S., McLaughlin P.J. (1992). Maternal exposure to opioids and the developing nervous system: laboratory findings. En *Maternal substance abuse and the developing nervous system* (Editado por Zagon I.S., Slotkin T.A.), pp. 241-282. Accademic Press Inc. London.
  - Zagon I.S., McLaughlin P.J., Thompson C.I. (1979). Development of motor activity in young rats following perinatal methadone exposure. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10: 743-749.
  - Zagon I.S., Sassini J.W., Allison G., McLaughlin P.H. (1995). Conserved expression of the opioid growth factor [Met<sup>5</sup>]-enkephalin, and the zeta ( $\zeta$ ) opioid receptor in vertebrate cornea. *Brain Res.* 671: 105-111.

- Zakarian S., Smyth D. (1982). Review article: distribution of  $\beta$ -endorphin related peptides in rat pituitary and brain. *Biochem. J.* 202: 561-571.
- Zaki P.A., Bilsky E.J., Vanderah T.W., Lai J., Evans C.J., Porreca F. (1996). Opioid receptor types and subtypes: the  $\delta$  receptor as a model. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 379-401.
- Zastawny R.L., George S.R., Nguyen T., Cheng R., Tsatsos J., Briones-Urbina R., O'Dowd B.F. (1994). Cloning characterization, and distribution of a  $\mu$  opioid receptors. *J. Neurochem.* 62: 2099-2105.
- Zhang H.T., Xu Z.M., Luo Z.P., Qin B.Y. (1996). Anxiogenic effect of naltrexone in social interaction test in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 17: 314-317.
- Zhang S.W., Yu L.C. (1995). Identification of dynorphins as endogenous ligands for an opioid receptor-like orphan receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 22772-22776.
- Zhu Y., King M., Schuller A., Unterwald G., Pasternak G., Pintar J.E. (1997). Genetic disruption of the mouse  $\delta$  opioid receptor gene. *Soc. Neurosci. Abst.* 23: 584.
- Zimmerman D.M., Leander J.D. (1990). Selective opioid receptor and antagonist: research tools and potential therapeutic agents. *J. Med. Chem.* 33: 896-902.
- Zukin R.S., Sugarman J.R., Fitz-Syage M.L., Gardner E.L., Zukin S.R., Gintzler A.R. (1982). Naltrexone-induced opiate receptor supersensitivity. *Brain Res.* 245: 285-292.

