

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;
Física; Geología; Historia; Ingeniería;
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina,
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.
A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 131-Gar
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas y regulación de la síntesis de monoaminas / Jesús A. García Sevilla
García Sevilla, Jesús Andrés.
1031764



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Jesús A. García Sevilla

Receptores opiáceos,
endorfinas y regulación de
la síntesis de monoaminas
en el sistema nervioso central.

131 Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas / Jesús A. García Sevilla

FJM
Uni-
131
Gar
131

Fundación Juan March
Serie Universitaria



131

Jesús A. García Sevilla

Receptores opiáceos,
endorfinas y regulación de
la síntesis de monoaminas
en el sistema nervioso central.



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de Extranjero, 1976, individual.
Departamento de Medicina, Farmacia y Veterinaria.
Centro de trabajo: Departamento de Farmacología de la
Universidad de Göteborg. Suecia.*

Depósito Legal: M - 29697 - 1980

I.S.B.N. : 84 - 7075 - 177 - 8

Impresión: Gráficas Ibérica, Tarragona, 34-Madrid - 7

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su agradecimiento a las siguientes personas y entidades:

Al Dr. Arvid Carlsson del Instituto de Farmacología de la Universidad de Göteborg (Suecia), co-autor y bajo cuya dirección se realizó este trabajo. Por su contagiosa iniciativa, vocación y sencillez.

Al Dr. Tor Magnusson del citado Instituto, co-autor y de quién aprendí la necesidad de desarrollar capacidades artesanales para sobrevivir en este oficio.

A la difunta Dra. Margit Lindqvist del citado Instituto, por iniciarme en el virtuosismo de la disección del cerebro de la rata.

A la Dra. Liisa Ahtee del Instituto de Farmacología de la Universidad de Helsinki, co-autora, por las muchas horas de trabajo conjunto en el laboratorio.

A las técnicas de laboratorio Barbro Jörblad y Birgitta Holmgren por su ayuda en la materialización de experimentos.

A la Fundación Juan March que generosamente financió al autor durante el desarrollo de esta investigación (1976-1978).

La presente memoria esta basada en resultados publicados en los siguientes artículos científicos:

1. Garcia-Sevilla, J.A.; L. Ahtee; T. Magnusson y A. Carlsson: Opiate receptor-mediated changes in monoamines synthesis in rat brain. *J. Pharm. Pharmac.* 30: 613-621 (1978)
2. Garcia-Sevilla, J.A.; T. Magnusson y A. Carlsson: Effects of enkephalins and two enzyme resistant analogues on monoamine synthesis and metabolism in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310: 211-218 (1980)

I N D I C E

	<u>Página</u>
I INTRODUCCION.....	9
II. MATERIAL Y METODOS	11
III. RESULTADOS	16
IV. DISCUSION	25
V. BIBLIOGRAFIA.....	31
VI. FIGURAS.....	36
VII. TABLAS.....	42

I. INTRODUCCION.

El descubrimiento y caracterización de receptores opiáceos en el cerebro de mamíferos y la búsqueda deliberada y hallazgo de sus "ligandos" (agonistas) endógenos, constituye uno de los hitos más importantes y creadores de la moderna neurobiología (véase Goldstein, 1976). Estos agonistas endógenos de los receptores opiáceos se conocen con el nombre genérico de endorfinas (morfinas endógenas).

Estudios anteriores a este descubrimiento habían demostrado una estrecha conexión entre los neurotransmisores clásicos del cerebro y algunas acciones de la morfina. Así, la administración de morfina incrementa el recambio (turnover) de catecolaminas en el cerebro por un mecanismo sensible a la naloxona (Clouet y Ratner, 1970; Smith et al., 1970). Otros analgésicos narcóticos desarrollan el mismo tipo de acciones, especialmente la de incrementar el recambio (turnover) del neurotransmisor dopamina (véase Kuschinsky, 1976).

Estos descubrimientos sugieren que la morfina y demás analgésicos narcóticos modularían en realidad la actividad de neuronas catecolaminérgicas remediando la acción de las endorfinas sobre los receptores opiáceos. Este concepto sugeriría a su vez la existencia de una conexión funcional entre receptores opiáceos y sistemas monoaminérgicos en el sistema nervioso central.

Las endorfinas (Fig. 1) constituyen un grupo de péptidos de cadena corta con propiedades farmacológicas semejantes a la morfina, por lo que también se les conoce con el nombre de péptidos opiáceos. Bajo el término de encefalinas se engloban dos pentapeptidos de

origen natural, Met⁵-encefalina y Leu⁵-encefalina, descubiertos en el cerebro de mamíferos (Hughes et al. 1975). La beta-endorfina, de estructura más compleja y el más potente péptido opiáceo endógeno conocido, fue descubierta más tarde (Li y Chung, 1976). Es de interés señalar que las estructuras químicas de estos péptidos opiáceos presentan estrechas similitudes. Las encefalinas son de estructura idéntica salvo en el aminoácido terminal y una de ellas, la Met⁵-encefalina, puede ser identificada como el fragmento 61-65 de la beta-endorfina (Fig. 1).

Las encefalinas poseen una amplia y desigual distribución regional en el sistema nervioso central (Hong et al., 1977; Hughes et al., 1977) que corresponde estrechamente con la de receptores opiáceos (véase Snyder y Simantov, 1977). Las encefalinas se localizan subcelularmente en las fracciones sinaptosómica y microsomal (Osborne et al., 1978a) pudiendo ser liberadas in vitro por un mecanismo dependiente del ión calcio (Henderson et al., 1978; Iversen et al., 1978; Osborne et al., 1978b). Estas observaciones sugieren que las encefalinas podrían jugar el papel de un neurotransmisor-neuromodulador en el sistema nervioso central (véase Frederickson, 1977).

Esta investigación fue planificada con la idea de estudiar el posible papel modulador de las endorfinas sobre el recambio (turnover) de monoaminas en el cerebro. La manipulación farmacológica del receptor opiáceo, a través de los efectos de la morfina y de los antagonistas de los narcóticos, y su repercusión sobre la síntesis de monoaminas, también fue estudiada como premisa de una posible regulación fisiológica. Dada la inestabilidad química de las encefalinas naturales, también se estudiaron los efectos de dos encefalinas sintéticas y

resistentes a la degradación enzimática (DALA y FK 33-824) (Fig. 1).

II. MATERIAL Y METODOS.

Animal de experimentación.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (Anticimex^R, Stockholm) y de un peso aproximado de 200-250 g. Los animales fueron alojados a 24°C bajo un ciclo periódico de luz-obscuridad de 12 horas y recibieron como alimento una dieta comercial y agua de grifo ad libitum.

Fármacos.

Clorhidrato de morfina (Pharmacopoea Nordica), clorhidrato de naloxona y clorhidrato de naltrexona (Laboratorios Endo, Garden City, New York), clorhidrato de 3-hidroxi-bencilhidracina (NSD 1015; sintetizado por el Dr. P. Lindberg, Instituto de Farmacología, Universidad de Goteborg) y N-(DL-seril)-N²-(2,3,4-trihidroxi-bencil) hidracina (Ro 4-4602 o benseracida, F. Hoffmann-La Roche Co., Basle). Los fármacos se disolvieron en una solución de cloruro sódico al 0.9% (suero salino) y se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.). Las dosis de morfina, naloxona y naltrexona mencionadas en el texto se refieren a las de sus respectivas bases libres.

Beta-endorfina humana sintética (fragmento 61-91 de la beta-lipotropina; gentileza del Dr. C.H. Li, Universidad de California, San Francisco); metionina [Met⁵]-encefalina, leucina [Leu⁵]-encefalina y [D-Ala²]-metionina-encefalina amida (DALA) (Serva Feinbiochemica,

Heidelberg) y $[\text{D-Ala}^2, \text{MePhe}^4, \text{Met(0)}^5\text{-ol}]$ -encefalina (FK 33-824; gentileza del Dr. Roemer, Sandoz Ltd., Basle). Los péptidos opiáceos se disolvieron en suero salino y se inyectaron por vía intracerebroventricular (i.c.v.).

Implantación de cánulas en los ventrículos laterales del cerebro.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) y los cráneos expuestos por medio de una incisión en la línea media. En ambos parietales se trepanó un agujero 2 mm posterior al bregma y 2 mm lateral a la sutura sagital. A través de ellos se implantaron cánulas heparinizadas de polietileno (Portex^R) de 0.75-0.30 mm de diámetro externo e interno, respectivamente; las cuales alcanzaron los ventrículos laterales 4 mm por debajo de la superficie del cráneo. Las cánulas se mantuvieron en posición con cemento acrílico dental que se extendió entre dos tornillos metálicos colocados a ambos lados del cráneo y que actuaron como soportes.

Los experimentos se realizaron dos días después de la operación tras la recuperación funcional de los animales. La beta-endorfina se inyectó en dosis de 1.25 a 10 μg en el ventrículo lateral derecho y a los 30 segundos una dosis idéntica fue inyectada en el ventrículo lateral izquierdo (el volumen de inyección fue de 10 μl de una solución de beta-endorfina seguido por 5 μl de suero salino en cada ventrículo). Las encefalinas (500 μg) y los análogos sintéticos DALA (4-256 μg) y FK 33-824 (3 ng- 1 μg) fueron administrados siguiendo la misma pauta. Las ratas control recibieron 15 μl de suero salino en cada ventrículo lateral. La correcta posición de las cánulas fue verificada durante la autopsia, rechazándose los animales que presentaron una implantación deficiente.

Determinación del recambio (turnover) de monoaminas en el cerebro de animales intactos.

a) Síntesis de monoaminas.

La actividad in vivo de los enzimas tirosina hidroxilasa (EC 1.14.3a) y triptófano hidroxilasa, enzimas limitantes de la síntesis de monoaminas, se valoró midiendo durante 30 minutos la acumulación endógena de los aminoácidos 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y 5-hidroxitriptófano (5-HTP) tras inhibición de la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (EC 4.1.1.26) con una dosis supramaximal de NSD 1015 (100 mg kg i.p.). Para detalles del método véase Carlsson et al., 1972.

Estos experimentos fueron diseñados para estudiar los efectos de la morfina, de los antagonistas de los narcóticos (naloxona y naltrexona) y de los diversos péptidos opiáceos (beta-endorfina, encefalinas y análogos sintéticos) sobre la velocidad de formación de noradrenalina, dopamina y serotonina.

b) Utilización de monoaminas.

La utilización funcional de noradrenalina, dopamina y serotonina se estudió determinando la reducción de sus respectivas concentraciones endógenas tras inhibición de la síntesis de monoaminas por medio de otro inhibidor de la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, la benseracida (800 mg kg, i.p.). Para detalles del método véase Andén et al., 1967.

Tras la administración de benseracida, las encefalinas (500 µg) y los análogos sintéticos DALA (50 µg) y FK 33-824 (1 µg) se inyectaron por vía i.c.v., inyectándose una segunda dosis que representó el 40% de

la primera al cabo de 25 minutos. La pauta de administración fue idéntica a la descrita anteriormente. Los animales control recibieron por vía i.c.v. un volumen idéntico de suero salino. Las ratas se decapitaron 60 minutos después de la administración de benseracida, determinándose el contenido endógeno de noradrenalina, dopamina, serotonina y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).

Estos experimentos fueron diseñados para estudiar el efecto de las encefalinas y análogos sintéticos sobre la velocidad de desaparición de monoaminas tras inhibición de síntesis, la cual depende principalmente del grado de actividad neuronal (Andén et al., 1969).

Disección del cerebro.

Las ratas fueron decapitadas y los cerebros extraídos lo más rápidamente posible y disecados a 4°C sobre una cápsula de Petri en las siguientes regiones: (1) sistema límbico del cerebro anterior comprendiendo el tubérculo olfatorio, la parte medial del núcleo acúmbico, el núcleo amigdalóideo central y parte del paleocortex; (2) cuerpo estriado; (3) el resto de los hemisferios cerebrales incluyendo el hipocampo (citado como hemisferios); (4) diencéfalo y (5) tronco cerebral inferior. En algunos experimentos, las regiones (3), (4) y (5) se utilizaron conjuntamente citándose en el texto como "resto". En todos los casos tanto el cerebelo como la glándula pineal fueron descartados.

La dopamina es la catecolamina predominante en las regiones cerebrales (1) y (2) y la noradrenalina en las (3), (4) y (5). La serotonina se encuentra en mayor proporción en las regiones cerebrales (4) y

(5). Para detalles de la disección del cerebro véase Carlsson y Lindqvist (1973).

Las diferentes regiones cerebrales se congelaron, se pesaron y se conservaron a -80°C . En los experimentos de síntesis de monoaminas se utilizaron como muestras regiones cerebrales idénticas procedentes de dos cerebros. En los experimentos de utilización de monoaminas se emplearon como muestras cerebros enteros.

Determinación de monoaminas, precursores y metabolitos.

Las regiones cerebrales o los cerebros enteros se homogenizaron en 10 ml de ácido perclórico 0.4 N conteniendo 5 mg de metabisulfito sódico y 20 mg de EDTA (volumen final de 10.3 ml.). Los homogenizados se centrifugaron a $10.000\times g$ durante 10 minutos a 0°C y el sobrenadante se purificó en una columna cromatográfica de intercambio fuertemente catiónico (Dowex 50W, X-4) (Kehr *et al.*, 1972; Atack y Magnusson, 1978). Tras elución selectiva se realizaron las siguientes determinaciones espectrofotofluorimétricas: tirosina (Waalkes y Udenfriend, 1957), DOPA (Kehr *et al.*, 1972), triptófano (Bédard *et al.*, 1972), 5-HTP (Atack y Lindqvist, 1973), dopamina (Atack, 1973), noradrenalina (Bertler *et al.*, 1958; Kehr *et al.*, 1976), serotonina y 5-HIAA (Atack y Lindqvist, 1973).

Métodos estadísticos.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el test-t de Student para la comparación de medias y un análisis de varianza seguido de un test-t para el estudio conjunto de grupos. El nivel de significancia estadística se escogió como $P=0.05$.

III. RESULTADOS.a) Efecto de la morfina sobre la síntesis de monoaminas en el cerebro.

La administración de morfina (3-30 mg/kg; i.p.) 1 hora antes del sacrificio de los animales, incrementó la formación de DOPA, pero no la de 5-HTP, en el cerebro de ratas tratadas con el inhibidor de la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, NSD 1015 (Tabla 1) Este efecto fue dosis dependiente en las regiones cerebrales ricas en dopamina, como el sistema límbico y el cuerpo estriado. Por el contrario, en las áreas cerebrales en las que la catecolamina predominante es la noradrenalina (citadas como "resto") sólo la dosis mayor de morfina (30 mg/kg) incrementó de forma significativa la acumulación de DOPA tras NSD 1015.

En este intervalo de tiempo, la morfina (3-30 mg/kg) no modificó la concentración endógena de tirosina en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas. Por el contrario, la concentración de triptófano en el "resto" del cerebro se incrementó en un 30-40% ($p < 0.05$) respecto a la de los animales control (resultados no presentados).

Cuando el intervalo de tiempo entre la administración del narcótico y el sacrificio de los animales se prolongó hasta las 2 horas, la síntesis de DOPA inducida por la morfina (30 mg/kg) fue ligeramente inferior a la observada tras 1 hora en el sistema límbico y en el "resto" del cerebro. Sin embargo, en el cuerpo estriado la acumulación de DOPA tras NSD 1015 siguió incrementando de forma significativa, llegando a casi doblar la cantidad acumulada en los controles 2 horas después de la administración de morfina (Tabla 2).

Con este intervalo de tiempo (2 horas) la síntesis de 5-HTP y las concentraciones de tirosina tendieron a incrementar, aunque únicamente en el "resto" del cerebro fue significativo el aumento (34% para el 5-HTP y 71% para la tirosina). La concentración endógena de triptófano se incrementó de forma moderada pero significativa en todas las regiones cerebrales (Tabla 2).

b) Efecto de la naloxona y naltrexona sobre la síntesis de monoaminas en el cerebro.

La inyección de naloxona (10-100 mg/kg; i.p.), 1 hora antes del sacrificio de los animales, disminuyó la síntesis de DOPA en las regiones cerebrales ricas en dopamina (sistema límbico y cuerpo estriado) pero no en aquellas cuya catecolamina predominante es la noradrenalina ("resto") (Tabla 3). Sin embargo, este efecto no fue dosis dependiente en el intervalo de dosis estudiado, puesto que la dosis menor de naloxona (10 mg/kg) ya indujo la máxima inhibición de síntesis (alrededor del 20-25%). Es de interés señalar que la naloxona (10-100 mg/kg) no modificó la concentración endógena de tirosina en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas (datos no presentados).

En el cuerpo estriado, la naloxona (10 mg/kg) también disminuyó de forma moderada pero significativa la acumulación de 5-HTP tras NSD 1015 (Tabla 3). Dosis superiores (30 mg/kg) de este antagonista puro de los narcóticos fueron necesarias para disminuir las concentraciones de triptófano en el sistema límbico (13%; $p < 0.05$) y en el "resto" del cerebro (20%; $p < 0.01$) (datos no presentados).

En el sistema límbico, dosis menores de naloxona (1 mg/kg) e intervalos de tiempo mayores (90 minutos) también disminuyeron la síntesis

de DOPA y de 5-HTP sin modificar las concentraciones endógenas de sus respectivos precursores (Tabla 4).

La naltrexona (10-100 mg/kg; i.p.), otro antagonista puro de los narcóticos con las mismas propiedades farmacológicas que la naloxona pero con una duración de acción mayor, también disminuyó en la misma proporción la síntesis de DOPA en el sistema límbico y en el cuerpo estriado (Tabla 5). Como la naloxona, la naltrexona no modificó la acumulación de DOPA tras NSD 1015 en el "resto" del cerebro donde la catecolamina predominante es la noradrenalina. En esta región cerebral, la naltrexona (10 mg/kg) disminuyó de forma significativa la síntesis de 5-HTP. A diferencia de la naloxona, la naltrexona no modificó las concentraciones de triptófano en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas (datos no presentados).

c) Efecto de la beta-endorfina sobre la síntesis de monoaminas en el cerebro.

La inyección i.c.v. del péptido opiáceo beta-endorfina (2.5-20 µg/rata) incrementó la acumulación de DOPA tras NSD 1015 en diversas regiones cerebrales (Fig. 2). Aunque pequeñas dosis del péptido (2.5 y 5 µg/rata) incrementaron la formación de DOPA en el sistema límbico (40%; $p < 0.01$ y 67%; $p < 0.005$, respectivamente) y en los hemisferios cerebrales (39%; $p < 0.05$ y 77%; $p < 0.005$, respectivamente); dosis mucho mayores (10-20 µg/rata) fueron necesarias para causar un incremento significativo en el diencefalo (50%; $p < 0.01$ y 48%; $p < 0.01$, respectivamente) y en el tronco cerebral (20%; N.S. y 44%; $p < 0.05$, respectivamente).

Como muestra la figura 2, las curvas dosis-respuesta para este efec-

to de la beta-endorfina fueron aproximadamente lineales hasta los 5 $\mu\text{g}/\text{rata}$ en el sistema límbico (100% de incremento máximo; $p < 0.001$), en el cuerpo estriado (45% de incremento máximo; $p < 0.005$), en los hemisferios cerebrales (85% de incremento máximo; $p < 0.005$) y en el diencéfalo (50% de incremento máximo; $p < 0.01$). En estas regiones cerebrales y tras alcanzarse el efecto máximo, un nuevo incremento en la dosis de beta-endorfina (20 $\mu\text{g}/\text{rata}$) produjo un efecto menor. En el tronco cerebral la relación dosis-respuesta para la beta-endorfina fue equívoca debido a la dispersión de los valores control.

La figura 3 muestra la relación tiempo-efecto de una dosis única de beta-endorfina (5 $\mu\text{g}/\text{rata}$) sobre la síntesis de DOPA en tres regiones cerebrales de la rata. En aquellas áreas cerebrales donde predomina la dopamina (sistema límbico y cuerpo estriado) el incremento máximo en la formación de DOPA ocurrió ligeramente más tarde que en los hemisferios cerebrales en los que la catecolamina predominante es la noradrenalina. El efecto máximo en el sistema límbico se alcanzó 1 hora después de la inyección i.c.v. de beta-endorfina (45%; $p < 0.05$) siendo todavía manifiesto a los 90 minutos ($\sim 45\%$; $p < 0.05$). En el cuerpo estriado el incremento máximo fue mayor (100%; $p < 0.005$) aunque se alcanzó en el mismo intervalo de tiempo y su duración se extendió hasta los 120 minutos (60%; $p < 0.025$). En los hemisferios cerebrales, por último, la máxima formación de DOPA se alcanzó a los 40 minutos (57%; $p < 0.025$), siendo el efecto todavía aparente 60 minutos (46%; $p < 0.05$) después de la administración de beta-endorfina.

La figura 4 pone de manifiesto que los incrementos inducidos por la beta-endorfina (5 $\mu\text{g}/\text{rata}$) sobre la síntesis de DOPA fueron antagonizados por la naloxona (10 mg/kg; s.c.), si bien en este experimento en particular no todos los incrementos mostraron significación estadística.

En contraste con la formación de DOPA, la síntesis de 5-HTP no se vió modificada en ninguna región cerebral 40 minutos después de la inyección i.c.v. de beta-

endorfina (2.5-20 ug/rata) (datos no presentados). A intervalos de tiempo mayores, sin embargo, la beta-endorfina indujo aumentos significativos en la síntesis de 5-HTP en todas las regiones cerebrales excepto en los hemisferios. Los incrementos máximos (50-80%) se alcanzaron 90-120 minutos después de la administración del péptido opiáceo (Tabla 6).

La tabla 7 muestra las relaciones dosis-efecto y tiempo-respuesta para el efecto de la beta-endorfina sobre las concentraciones de tirosina en diversas regiones cerebrales de la rata. Como puede apreciarse, la beta-endorfina (2.5-20 µg/rata) no modificó las concentraciones cerebrales de tirosina 40 minutos después de su administración. Sin embargo, tras un intervalo de tiempo mayor (60-120 minutos) una dosis moderada (5 µg/rata) del péptido indujo incrementos significativos (30-60%) en todas las áreas cerebrales. De forma semejante, la beta-endorfina (2.5-20 µg/rata) no indujo cambios en las concentraciones cerebrales de triptófano 40 minutos después de su administración. A los 120 minutos, sin embargo, los incrementos inducidos por el péptido fueron significativos en todas las regiones cerebrales (35-40%) (Tabla 8).

d) Efecto de las encefalinas y de los análogos sintéticos DALA y FK 33-824 sobre la actividad in vivo de la enzima tirosina hidroxilasa.

La inyección i.c.v. de [Met⁵]- o [Leu⁵]-encefalina (500 µg/rata) incrementó la formación de DOPA en el cerebro de ratas tratadas con el inhibidor de la decarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos NSD 1015 (Tabla 9). Sin embargo, los incrementos inducidos por la [Leu⁵]-encefalina (35-65%) en las diferentes regiones cerebrales fueron significativamente mayores que los inducidos por la [Met⁵]-encefalina (10-35%). Como cabría esperar, los aumentos de síntesis de DOPA inducidos por ambas encefalinas fueron antagonizados en todas las regiones cerebrales por la administración previa de naloxona (10 mg/kg), excepto en el

tronco cerebral para la [Met⁵]-encefalina (Tabla 9).

Los análogos sintéticos de la [Met⁵]-encefalina, DALA y FK 33-824, ambos resistentes a la degradación enzimática, causaron el mismo efecto pero con una potencia mucho mayor. Así, tanto DALA (4-256 µg/rata) como el derivado FK 33-824 (0.003-1 µg/rata) incrementaron la síntesis de DOPA de forma dosis dependiente y por un mecanismo sensible a la naloxona (Figs. 5 y 6). Como muestran las figuras, las curvas log dosis-efecto para ambos análogos fueron aproximadamente lineales en el intervalo de dosis estudiado. Con el derivado FK 33-824 se obtuvieron coeficientes de correlación significativos ($r=0.84-0.96$; $p<0.001$) en todas las regiones cerebrales, excepto en el tronco cerebral (Fig. 6). Tras la administración de DALA, por el contrario, sólo la regresión log dosis-efecto en el tronco cerebral alcanzó significación estadística ($r=0.65$; $p<0.01$) (Fig. 5).

El efecto estimulante sobre la síntesis de DOPA inducido por los cuatro péptidos opiáceos, aunque cualitativamente idéntico, difirió marcadamente en potencia. En las diversas regiones cerebrales el compuesto FK 33-824 fue 100-1000 veces más potente que el análogo DALA y éste unas 100 veces más potente que las encefalinas. Las áreas límbicas del cerebro ricas en dopamina fueron particularmente sensibles a la acción del análogo FK 33-824, el cual incrementó significativamente la síntesis de DOPA tras NSD 1015 (43%; $p<0.001$) a un nivel de dosis muy reducido (3 ng/rata) (Fig. 6). Es de interés señalar que este derivado de la [Met⁵]-encefalina también aumentó la acumulación de DOPA en el sistema límbico tras su administración sistémica (5 mg/kg; s.c.).

Tanto la [Met⁵]- como la [Leu⁵]-encefalina incrementaron de forma muy marcada las concentraciones de tirosina en todas las regiones cerebrales, excepto en el cuerpo estriado donde este efecto fue moderado (Tabla 10). En las diversas áreas cerebrales los incrementos inducidos por la [Met⁵]-encefalina (85-140%) fueron

significativamente mayores que los inducidos por la $[\text{Leu}^5]$ -encefalina (50-70%). Para ambos péptidos este efecto no fue antagonizado por la administración previa de naloxona (10 mg/kg). A diferencia de las encefalinas, dosis máximas de DALA (125 $\mu\text{g}/\text{rata}$) y del derivado FK 33-824 (1 $\mu\text{g}/\text{rata}$) no incrementaron las concentraciones de tirosina en el cerebro (Tabla 10).

e) Efecto de las encefalinas y de los análogos sintéticos DALA y FK 33-824 sobre la actividad in vivo de la enzima triptófano hidroxilasa.

La inyección i.c.v. de $[\text{Met}^5]$ - o $[\text{Leu}^5]$ -encefalina (500 $\mu\text{g}/\text{rata}$) incrementó la formación de 5-HTP en el cerebro de ratas tratadas con NSD 1015 (Tabla 11). La $[\text{Leu}^5]$ -encefalina fue inactiva en el sistema límbico, cuerpo estriado y hemisferios, mientras que la $[\text{Met}^5]$ -encefalina indujo un pequeño incremento (10-15%), aunque significativo, en las dos últimas regiones cerebrales citadas. En el diencéfalo y en el tronco cerebral, las encefalinas incrementaron consistentemente la síntesis de 5-HTP y para ambos péptidos este efecto fue de la misma magnitud (20-30%). De forma inesperada, el efecto estimulante sobre la síntesis de 5-HTP inducido por la $[\text{Met}^5]$ - y $[\text{Leu}^5]$ -encefalina no fue antagonizado por la administración previa de naloxona (10 mg/kg) (Tabla 11).

El análogo DALA (125 $\mu\text{g}/\text{rata}$) incrementó la formación de 5-HTP en el diencéfalo y tronco cerebral (20%) de una forma similar a las encefalinas; pero su efecto en el sistema límbico, cuerpo estriado y hemisferios (20-60%) fue mayor que el de sus análogos naturales (Tabla 12). Dosis menores del derivado DALA no causaron incrementos en la acumulación de 5-HTP tras NSD 1015 (resultados no presentados). El compuesto FK 33-824 incrementó de forma moderada la síntesis de 5-HTP en diversas regiones cerebrales (10-25%) (Tabla 12). A diferencia de las encefalinas el efecto estimulante sobre la síntesis de 5-HTP inducido por ambos análogos sintéticos fue completamente bloqueado por la administración previa de naloxona (10 mg/kg (Tabla 12).

La tabla 13 muestra el efecto de las encefalinas y de sus análogos sintéticos sobre las concentraciones de triptófano en diversas regiones cerebrales de la rata. Como puede apreciarse los aumentos inducidos por la $[\text{Met}^5]$ - y $[\text{Leu}^5]$ -encefalina sólo fueron parcialmente antagonizados por la naloxona (10 mg/kg), mientras que los inducidos por el derivado DALA (20%) fueron eficientemente bloqueados por el mencionado antagonista de los narcóticos. El compuesto FK 33-824 no incrementó las concentraciones de triptófano en ninguna región cerebral, excepto en el sistema límbico (17%; $p < 0.05$) (Tabla 13), siendo bloqueado el incremento por la naloxona (resultado no presentado).

f) Efecto de las encefalinas y de los análogos sintéticos DALA y FK 33-824 sobre la utilización de dopamina, noradrenalina y serotonina.

Cuando la síntesis de monoaminas en el cerebro fue inhibida con benseracida, tanto la $[\text{Met}^5]$ - como la $[\text{Leu}^5]$ -encefalina aceleraron de forma significativa la reducción de los niveles de dopamina y en mucha menor cuantía los de noradrenalina que no alcanzaron significación estadística (Tabla 14). El efecto de la $[\text{Leu}^5]$ -encefalina incrementando la utilización de dopamina fue mayor que el de la $[\text{Met}^5]$ -encefalina (34% vs. 18%; $p < 0.025$). Ambos péptidos opiáceos aceleraron de forma significativa la desaparición de serotonina que se acompañó por incrementos simultáneos de los niveles de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Tabla 14).

Resultados similares fueron obtenidos con los derivados sintéticos DALA y FK 33-824 pero a un nivel de dosis mucho menor. A diferencia de las encefalinas ambos análogos aceleraron de forma significativa la desaparición de noradrenalina en el cerebro. El compuesto FK 33-824 no aceleró la utilización de serotonina pero incrementó las concentraciones de su metabolito en el cerebro (Tabla 14).

g) Perfil de conducta de los animales tras la administración aguda de morfina, endorfinas y antagonistas de los narcóticos.

La administración aguda de morfina (3-30 mg/kg; i.p.) ocasionó a las pocos minutos la pérdida de los reflejos corneal y palpebral e indujo analgesia. La dosis menor de morfina (3 mg/kg) incrementó la locomoción de las ratas y la dosis mayor (30 mg/kg) indujo catatonía (hipertono muscular).

La administración i.c.v. de pequeñas dosis de beta-endorfina (2.5 µg/rata) no modificaron de forma aparente la conducta de los animales; dosis mayores (5-20 µg/rata), sin embargo, causaron la pérdida de los reflejos corneal y palpebral, exoftalmos, salivación e indujeron catatonía en un corto intervalo de tiempo (10 minutos). El cuadro descrito fue de larga duración (1 hora) y ninguna de sus manifestaciones se presentaron en animales previamente tratados con naloxona.

Ambas encefalinas (500 µg/rata) y sus análogos sintéticos DALA (4-250 µg/rata) y FK 33-824 (0.003-1 µg/rata) indujeron un patrón de conducta muy similar al de la morfina. La inyección i.c.v. de estos péptidos opiáceos causó la pérdida de los reflejos corneal y palpebral, exoftalmos, analgesia, salivación, catalepsia (acinesia) y catatonía. Este cuadro fue de corta duración para las encefalinas (alrededor de 10 minutos) y más duradero para los análogos sintéticos (más de 40 minutos). Grandes dosis del derivado DALA (125 µg/rata) indujeron conducta rotatoria a lo largo del eje longitudinal del cuerpo. El análogo sintético FK 33-824 también indujo el cuadro descrito tras su administración sistémica (5 mg/kg; s.c.).

La naloxona (1 mg/kg; s.c.) no sólo fue capaz de prevenir, si no también de revertir en pocos minutos el cuadro de conducta inducido por una gran dosis de DALA (125 µg/rata; i.c.v.).

Por último, es de interés señalar que la administración de naloxona y naltrexona indujo un efecto sedante tras dosis moderadas (10-30 mg/kg) y ligera catalepsia tras dosis mayores (100 mg/kg).

IV. DISCUSION.

La administración aguda de morfina, potente agonista del receptor opiáceo, incrementó la síntesis de dopamina en el cerebro de ratas intactas, mientras que la naloxona y naltrexona, antagonistas puros de los narcóticos, desencadenaron acciones opuestas. Estos resultados sugieren que los receptores opiáceos del cerebro y sus "ligandos" (agonistas) endógenos (endorfinas) participan en la regulación fisiológica de la síntesis del neurotransmisor dopamina.

El aumento de síntesis de dopamina inducido por la morfina involucraría una estimulación selectiva de la enzima tirosina hidroxilasa, ya que no sería el resultado de un mecanismo indirecto como el de incrementar la tasa endógena del aminoácido precursor. En efecto, mientras la morfina incrementó de forma dosis dependiente la acumulación de DOPA tras NSD 1015, la concentración cerebral de tirosina no se modificó. La administración aguda de morfina produjo un incremento más tardío de la concentración cerebral de tirosina y sólo en aquellas regiones cerebrales en las que la noradrenalina es la catecolamina predominante (Tabla 2).

Existiría pues una neta disociación temporal entre ambos efectos de la morfina, sugiriendo que la estimulación de la síntesis de dopamina es el resultado de un efecto específico sobre la enzima tirosina hidroxilasa. Estos resultados confirman previas observaciones sobre el papel de la morfina y otros narcóticos como moduladores de la síntesis cerebral de catecolaminas (Smith et al., 1970; Smith et al., 1972).

La administración aguda de morfina no modificó la síntesis cerebral de serotonina,

pero sí el contenido endógeno de triptófano, en el intervalo de tiempo en que la síntesis de dopamina se vió incrementada por el narcótico (Tabla 1). No obstante, grandes dosis de morfina e intervalos de tiempo prolongados tendieron a incrementar la acumulación de 5-HTP tras NSD 1015. Sin embargo, la concentración endógena de triptófano se incrementó paralelamente (Tabla 2). Estos resultados sugieren una participación primaria de receptores opiáceos en la regulación del transporte de triptófano, el incremento del cual podría afectar secundariamente la síntesis de serotonina (véase Carlsson y Lindqvist, 1978).

De forma semejante a la morfina, la administración i.c.v. del péptido opiáceo beta-endorfina incrementó la síntesis de DOPA por un mecanismo sensible a la naloxona (Figs. 2 y 4), indicando que este efecto fue mediatizado a través de la estimulación de receptores opiáceos. Como en el caso de la morfina este efecto de la beta-endorfina no se correlacionó con los incrementos de tirosina inducidos por el péptido opiáceo (Tabla 7). La beta-endorfina incrementó la formación de DOPA tras NSD 1015 tanto en las regiones cerebrales ricas en dopamina (sistema límbico y cuerpo estriado) como en aquellas en que el neurotransmisor predominante es la noradrenalina (hemisferios, diencéfalo y tronco cerebral). Estos resultados sugieren que, a diferencia de la morfina, el péptido opiáceo beta-endorfina modula por igual la síntesis de ambas catecolaminas en el cerebro. Dado que la beta-endorfina es un péptido endógeno de gran potencia y afinidad por el receptor opiáceo (Bloom *et al.*, 1976) podría especularse que este "ligando" (agonista) y/u otros péptidos opiáceos similares (encefalinas) serían los mediadores naturales que, a través de la estimulación de receptores opiáceos, contribuirían en la modulación fisiológica de la síntesis de catecolaminas en el cerebro. Esta sugerencia tendría apoyo en la observada disminución de síntesis de catecolaminas en el cerebro de ratones tolerantes a la morfina (Rosenman y Smith, 1972).

La beta-endorfina desarrolló acciones paralelas a las de la morfina en cuanto a modificar la síntesis de serotonina en el cerebro. Como en el caso del narcótico, la beta-endorfina incrementaría la síntesis de serotonina como consecuencia de una modificación del transporte de triptófano (véanse tablas 6 y 8).

Como la morfina y la beta-endorfina, la administración i.c.v. de [Met⁵]- y [Leu⁵]-encefalina o de sus más estables análogos DALA y FK 33-824 estimuló la síntesis cerebral de dopamina, noradrenalina y serotonina por mecanismos sensibles a la naloxona. Los citados péptidos opiáceos también incrementaron la utilización de monoaminas en el cerebro tras inhibición de síntesis. Estos resultados suministran nueva evidencia en favor de un papel modulador de las encefalinas endógenas en la regulación a corto plazo de los sistemas monoaminérgicos centrales.

Las encefalinas y sus análogos sintéticos DALA y FK 33-824 incrementaron la acumulación de DOPA tras NSD 1015 tanto en las áreas del cerebro ricas en dopamina (sistema límbico y cuerpo estriado) como en aquellas en que predomina la noradrenalina (hemisferios, diencéfalo y tronco cerebral). Estos resultados fueron similares a los obtenidos con la beta-endorfina, sugiriendo que la regulación de ambos neurotransmisores (dopamina y noradrenalina) está bajo el control de endorfinas endógenas.

Como cabría esperar, los distintos péptidos opiáceos mostraron marcadas diferencias de potencia en cuanto a estimular la síntesis de catecolaminas en el cerebro (Tabla 9 y Figs. 5 y 6). Esta discrepancia entre encefalinas y análogos sintéticos sería la consecuencia de la rápida inactivación enzimática de la [Met⁵]- y [Leu⁵]-encefalina por peptidasas cerebrales todavía no bien caracterizadas (Meek et al., 1977; Dupont et al., 1977), lo que explicaría la necesidad de utilizar grandes dosis de encefalinas (500 µg/rata) para generar efectos neuroquímicos.

Los análogos sintéticos de la $[\text{Met}^5]$ -encefalina ofrecen un buen ejemplo de cómo la limitada potencia del péptido opiáceo endógeno puede ser incrementada tras la manipulación química de su molécula. En efecto, tanto la sustitución de glicina² por D-alanina y la transformación del grupo carboxílico en su amida (DALA), como la N-metilación del residuo fenilalanina y la transformación de la metionina en metioninol sulfóxido (FK 33-824) protegen frente a actividad peptidásica (Pert *et al.*, 1976; Roemer *et al.*, 1977) obteniéndose derivados sintéticos de gran potencia. Así, los análogos DALA y FK 33-824 fueron de 10^2 a 10^5 veces más potentes que las encefalinas en su capacidad de estimular la actividad *in vivo* de la tirosina hidroxilasa. Este efecto neuroquímico de las encefalinas fue particularmente notable en las regiones del cerebro ricas en dopamina (sistema límbico y cuerpo estriado), en las que el derivado FK 33-824 incrementó la síntesis de DOPA en dosis del orden de nanogramos (Fig. 6). Este potente análogo sintético también mostró actividad tras su administración sistémica, lo que confirma previas observaciones (Roemer *et al.*, 1977), indicando a la vez que la manipulación de la molécula de $[\text{Met}^5]$ -encefalina también posibilita la síntesis de análogos susceptibles de atravesar la barrera hematoencefálica.

Tanto la $[\text{Met}^5]$ - como la $[\text{Leu}^5]$ -encefalina incrementaron de forma muy marcada la concentración de tirosina en el cerebro (Tabla 10). Este efecto, sin embargo, no fue antagonizado por la naloxona, indicando la no participación de receptores opiáceos. No parece probable que un efecto inespecífico de este tipo pudiera explicar la específica estimulación (antagonizada por naloxona) de la síntesis de catecolaminas inducida por las encefalinas. De hecho, observaciones recientes han demostrado que el primer paso en la degradación enzimática de las encefalinas es la rotura del enlace amídico Tyr-Gly, liberando tirosina libre (Meek *et al.*, 1977; Dupont *et al.*, 1977). La tirosina liberada de la propia molécula de encefalina, podría muy bien explicar los marcados incrementos cerebrales de la misma tras la administración del péptido y la ausencia de antagonismo por naloxona. En

apoyo de esta posibilidad fue la observación de que ninguno de los análogos sintéticos (no susceptibles de degradación enzimática) de las encefalinas, DALA y FK 33-824, incrementó la concentración cerebral de tirosina (Tabla 10).

En las diferentes regiones cerebrales, los incrementos en la concentración de tirosina inducidos por la $[\text{Met}^5]$ -encefalina (85-140%) fueron siempre mayores que aquellos inducidos por la $[\text{Leu}^5]$ -encefalina (50-70%), sugiriendo que el primer péptido opiáceo fue más rápidamente inactivado por rotura enzimática de la molécula, lo que explicaría su menor actividad sobre la síntesis de DOPA (véanse Tablas 9 y 10).

Recientemente se ha sugerido que la $[\text{Met}^5]$ -encefalina disminuiría el recambio (turnover) de dopamina y noradrenalina en el cerebro, mientras que su análogo sintético DALA estimularía el de dopamina sin afectar el de noradrenalina (Calderini *et al.*, 1978). Sin embargo y como los mismos autores sugieren, la observada disminución del recambio (turnover) de catecolaminas inducida por la $[\text{Met}^5]$ -encefalina sería en realidad un artefacto que involucraría un efecto de dilución isotópico. En efecto, el recambio (turnover) de catecolaminas se midió valorando la conversión aparente de ^3H -tirosina en ^3H -dopamina y ^3H -noradrenalina durante un incremento simultáneo en la concentración endógena de tirosina inducida por el péptido. Con un diseño experimental más adecuado (medición de la acumulación de DOPA tras inhibición de la decarboxilasa) fue siempre posible demostrar que tanto la $[\text{Met}^5]$ -encefalina como su análogo sintético DALA estimulan la síntesis de catecolaminas y su utilización independientemente de la concentración cerebral de tirosina (véanse Tablas 9, 10 y 14).

Las encefalinas también incrementaron la formación de 5-HTP y la concentración cerebral de triptófano, pero estos efectos sólo fueron parcialmente antagonizados por la naloxona. Así pues, como en el caso de la morfina y de la beta-endorfina,

debe considerarse la posibilidad de que el simultáneo incremento en la concentración de triptófano pudiera secundariamente afectar la síntesis de serotonina en el cerebro. Sin embargo, tampoco se puede completamente descartar un efecto estimulante de las encefalinas sobre las neuronas serotoninérgicas, ya que, tras inhibición de síntesis, los péptidos opiáceos aceleraron la utilización de serotonina (Tabla 14). A diferencia de las encefalinas, el análogo sintético DALA incrementó la acumulación de 5-HTP tras NSD 1015 y la concentración de triptófano en el cerebro por mecanismos sensibles a la naloxona (Tablas 12 y 13). Como quiera que la utilización de serotonina se aceleró al mismo tiempo (Tabla 14), debería concluirse que este análogo de las encefalinas desarrolla un efecto específico sobre las neuronas serotoninérgicas. Sin embargo, este efecto sólo fue observado tras grandes dosis del péptido opiáceo (125 $\mu\text{g}/\text{rata}$). Dado que el derivado DALA estimuló la formación de DOPA con dosis muy inferiores (4 $\mu\text{g}/\text{rata}$), parece lógico nuevamente concluir que las encefalinas poseen una acción más selectiva sobre las neuronas catecolaminérgicas. El patrón de conducta inducido por las encefalinas y análogos sintéticos fue muy similar al descrito para la morfina (Browne *et al.*, 1979), lo que sugiere la existencia de mecanismos comunes en su desarrollo.

Como conclusión general, los resultados de este estudio demuestran que encefalinas endógenas, a través de la estimulación de receptores opiáceos, participan en la regulación fisiológica de la síntesis de catecolaminas en el cerebro.

No se conoce con exactitud la localización anatómica de estos receptores opiáceos. Recientes observaciones indican, sin embargo, que el efecto estimulante del péptido opiáceo DALA sobre la formación de DOPA en el núcleo caudado, persiste tras la destrucción de receptores dopaminérgicos con ácido kaínico (Biggio *et al.*, 1978). Esta observación sugiere, por tanto, que los receptores opiáceos responsables de aquél efecto se localizarían en los terminales nerviosos dopaminérgicos. Se sabe

por otra parte, de la existencia de receptores opiáceos presinápticos involucrados en la regulación de la liberación de transmisores en el sistema nervioso central. De hecho, se ha demostrado la existencia de receptores opiáceos presinápticos inhibitorios tanto en terminaciones nerviosas dopaminérgicas (Loh et al., 1976) como noradrenérgicas (Taube et al., 1977). Es posible, por tanto, que el incremento de síntesis de catecolaminas inducido por las encefalinas fuera el mecanismo compensatorio desencadenado para contrarrestar una liberación disminuída de dopamina y noradrenalina inducida por los péptidos opiáceos.

Los resultados de este estudio, al poner de manifiesto una participación de encefalinas endógenas en el control fisiológico de los sistemas catecolaminérgicos del cerebro, sugieren también su involucración fisiopatológica en ciertas psicosis como la esquizofrenia, donde tanto la dopamina como la noradrenalina parecen jugar un papel clave.

V. BIBLIOGRAFIA.

Andén, N.-E.; Corrodi, H.; Fuxe, K.: Turnover studies using synthesis inhibition. En Metabolism of amines in the brain (G. Hooper, ed.), pp. 38-47. London, McMillan 1969.

Andén, N.-E.; Fuxe, K.; Hökfelt, T.: Effect of some drugs on central monoamine nerve terminals lacking nerve impulse flow. Eur. J. Pharmacol. 1: 226-232 (1967)

Atack, C.V.: The determination of dopamine by a modification of the dihydroxyindol fluorimetric assay. Br. J. Pharmacol. 48: 699-714 (1973)

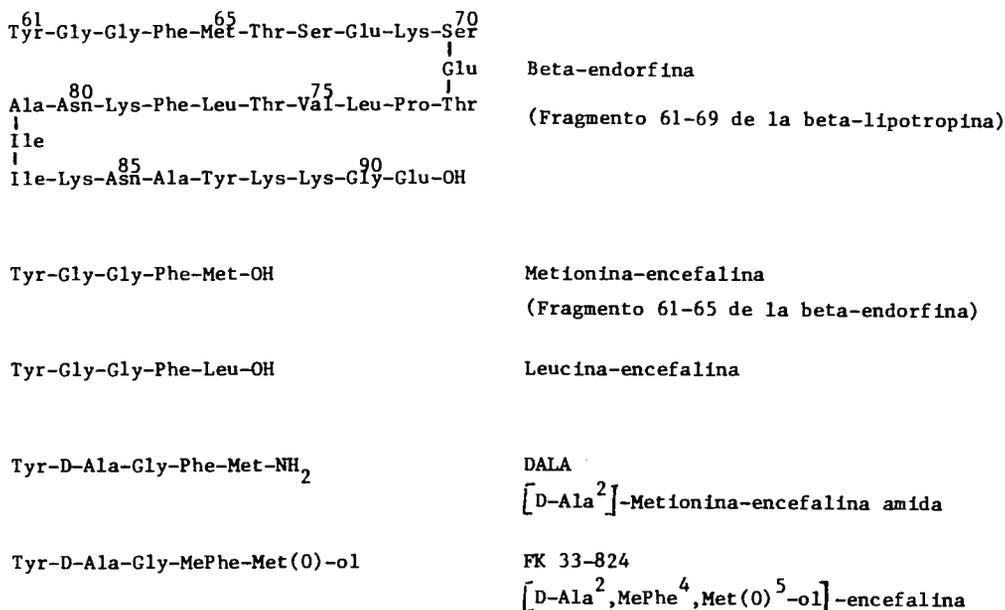
Atack, C.; Lindqvist, M.: Conjoint native and orthophthaldialdehyde-condensate assay for the fluorimetric determination of 5-hydroxyindoles in brain. Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol. 279: 267-284 (1973)

- Atack, C.; Magnusson, T.: A procedure for the isolation of noradrenaline (together with adrenaline), dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from the same sample using a simple column of strongly acidic cation exchange resin. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Kbh.)* 42: 35-57 (1978)
- Bédard, P.; Carlsson, A.; Lindqvist, M.: Effect of a transverse cerebral hemisection on 5-hydroxytryptamine metabolism in the rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 272: 1-15 (1972)
- Bertler, Å.; Carlsson, A.; Rosengren, E.: A method for the fluorimetric determination of adrenaline and noradrenaline in tissues. *Acta Physiol. Scand.* 44: 273-292 (1958)
- Biggio, G.; Casu, M.; Corda, M.G.; Di Bello, C.; Gessa, G.L.: Stimulation of dopamine synthesis in caudate nucleus by intrastriatal enkephalins and antagonism by naloxone. *Science (Washington)* 200: 552-554 (1978)
- Bloom, F.; Segal, D.; Ling, N.; Guillemin, R.: Endorphins: Profound behavioral effects in rats suggest new etiological factors in mental illness. *Science (Washington)* 194: 630-632 (1976)
- Browne, R.G.; Derrington, D.C.; Segal, D.S.: Comparison of opiate- and opioid-peptide-induced immobility. *Life Sci.* 24: 933-942 (1979)
- Calderini, G.; Consolazione, A.; Garattini, S.; Algeri, S.: Different effects of methionine-enkephalin and (D-Ala²) methionine-enkephalin amide on the metabolism of dopamine and norpeinephrine in rat brain. *Brain Research* 146: 392-399 (1978)
- Carlsson, A.; Davies, J.N.; Kehr, W.; Lindqvist, M.; Atack, C.V.: Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 275: 153-168 (1972)

- Carlsson, A.; Lindqvist, M.: Effect of ethanol on the hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat brain in vivo. *J. Pharm. Pharmacol.* 25: 437-440 (1973)
- Carlsson, A.; Lindqvist, M.: Dependence of 5-HT and catecholamines synthesis on concentrations of precursor amino-acids in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 303: 157-164 (1978)
- Clouet, D.H.; Ratner, M.: Catecholamine biosynthesis in brains of rats treated with morphine. *Science (Washington)* 168: 854-855 (1970)
- Dupont, A.; Cusan, L.; Garon, M.; Alvarado-Urbina, G.; Labrie, F.: Extremely rapid degradation of [^3H]-methionine-enkephalin by various rat tissues in vivo and in vitro. *Life Sci.* 21: 907-914 (1977)
- Frederickson, R.C.A.: Enkephalin pentapeptides - A review of current evidence for a physiological role in vertebrate neurotransmission. *Life Sci.* 21: 23-42 (1977)
- Goldstein, A.: Opioid peptides (endorphins) in pituitary and brain. *Science (Washington)* 193: 1081-1086 (1976)
- Henderson, G.; Hughes, J.; Kosterlitz, H.W.: In vitro release of Leu- and Met-enkephalin from the corpus striatum. *Nature (London)* 271: 677-679 (1978)
- Hong, J.S.; Yang, H.-Y.T.; Fratta, W.; Costa, E.: Determination of methionine enkephalin in discrete regions of rat brain. *Brain Research* 134: 383-386 (1977)
- Hughes, J.; Kosterlitz, H.W.; Smith, T.W.: The distribution of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the brain and peripheral tissues. *Br. J. Pharmacol.* 61: 639-647 (1977)
- Hughes, J.; Smith, T.W.; Kosterlitz, H.W.; Fothergill, L.A.; Morgan, B.A.; Morris, H.R.: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature (London)* 258: 577-579 (1975)

- Iversen, L.L.; Iversen, S.D.; Bloom, F.E.; Vargo, T.; Guillemin, R.: Release of enkephalin from rat globus pallidus in vitro. *Nature (London)* 271: 679-681 (1978)
- Kehr, W.; Carlsson, A.; Lindqvist, M.: A method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylalanine (Dopa) in brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 274: 273-280 (1972)
- Kehr, W.; Lindqvist, M.; Carlsson, A.: Distribution of dopamine in the rat cerebral cortex. *J. Neural Transm.* 38: 173-180 (1976)
- Kuschinsky, K.: Actions of narcotics on brain dopamine metabolism and their relevance for psychomotor effects. *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 26: 563-567 (1976)
- Li, C.H.; Chung, D.: Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 1145-1148 (1976)
- Loh, H.H.; Brase, D.A.; Sampath-Khanna, S.; Mar, J.B.; Way, E.L., Li, C.H.: Beta-endorphin in vitro inhibition of striatal dopamine release. *Nature (London)* 264: 567-568 (1976)
- Meek, J.L.; Yang, H.-Y.T.; Costa, E.: Enkephalin catabolism in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* 16: 151-154 (1977)
- Osborne, H.; Höllt, V.; Herz, A.: Subcellular distribution of enkephalins and endogenous opioid activity in rat brain. *Life Sci.* 22: 611-618 (1978a)
- Osborne, H.; Höllt, V.; Herz, A.: Potassium-induced release of enkephalins from rat striatal slices. *Eur. J. Pharmac.* 48: 219-221 (1978b)
- Pert, C.B.; Pert, A.; Chang, J.K.; Fong, B.T.W.: $[D-Ala^2]$ -met-enkephalinamide: A potent long-lasting synthetic pentapeptide analgesic. *Science (Washington)* 194: 330-332 (1976)

- Roemer, D.; Buescher, H.H.; Hill, R.C.; Pless, J.; Bauer, W.; Cardinaux, F.; Closse, A.; Hauser, D.; Huguenin, R.: A synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity. *Nature (London)* 268: 547-549 (1977)
- Rosenman, S.J.; Smith, C.B.: ^{14}C -Catecholamine synthesis in mouse brain during morphine withdrawal. *Nature (London)* 240: 153-155 (1972)
- Smith, C.B.; Villarreal, J.E.; Bednarczyk, J.H.; Sheldon, M.J.: Tolerance to morphine induced increases in ^{14}C -catecholamine synthesis in mouse brain. *Science (Washington)* 170: 1106-1108 (1970)
- Smith, C.B.; Sheldon, M.I.; Bednarczyk, J.H.; Villarreal, J.E.: Morphine-induced increases in the incorporation of ^{14}C -tyrosine into ^{14}C -dopamine and ^{14}C -norepinephrine in the mouse brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 180: 547-557 (1972)
- Snyder, S.H.; Simantov, R.: The opiate receptor and opioid peptides. *J. Neurochem.* 28: 13-20 (1977)
- Taube, H.D.; Starke, K.; Borowski, E.: Presynaptic receptor systems on the noradrenergic neurons of rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 299: 123-141 (1977)
- Waalkes, T.P.; Udenfriend, S.: A fluorimetric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J. Lab. Clin. Med.* 50: 733-736 (1957)

Aminoácidos

Ala	Alanina	Met	Metionina
Asn	Asparagina	Phe	Fenilalanina
Gly	Glicina	Pro	Prolina
Glu	Acido glutámico	Ser	Serina
Ile	Isoleucina	Thr	Treonina
Leu	Leucina	Tyr	Tirosina
Lys	Lisina	Val	Valina

Fig. 1 Estructuras primarias de algunos péptidos opiáceos (endorfinas).

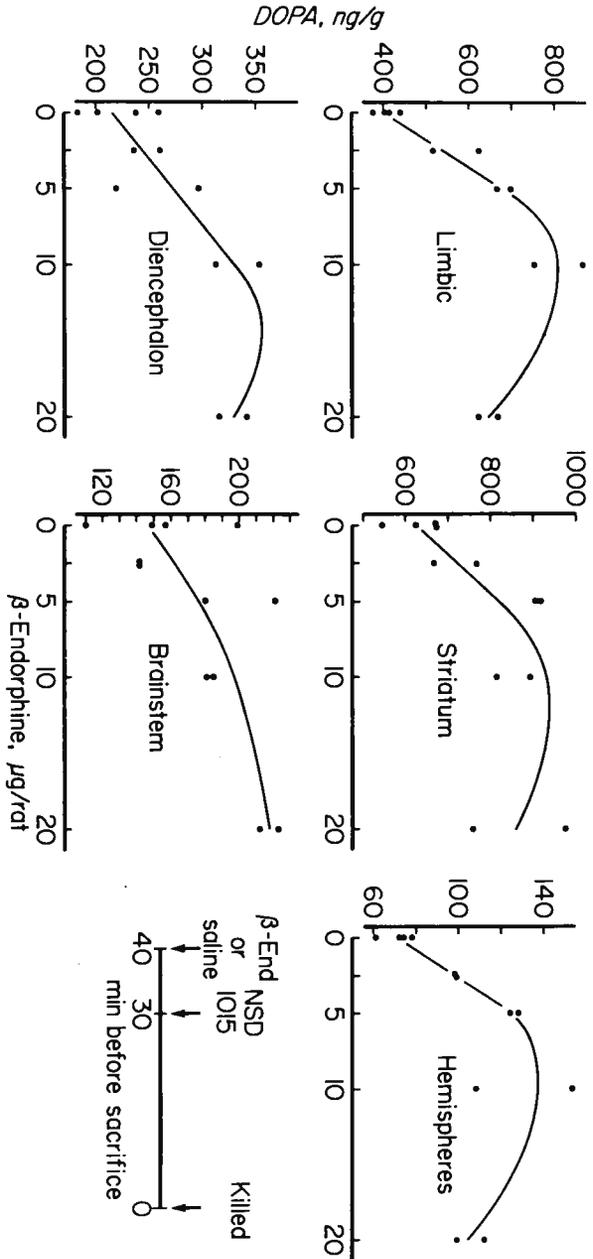


Fig. 2 Curvas dosis-respuesta para el efecto de la beta-endorfina sobre la

acumulación de DOPA tras NSD 1015 en diversas regiones cerebrales de la

rata. La beta-endorfina se inyectó por vía i.c.v. 10 minutos antes del

NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.), sacrificándose los animales al cabo de otros

30 minutos. Las ratas control recibieron i.c.v. un volumen idéntico de

suero salino 10 minutos antes del NSD 1015.

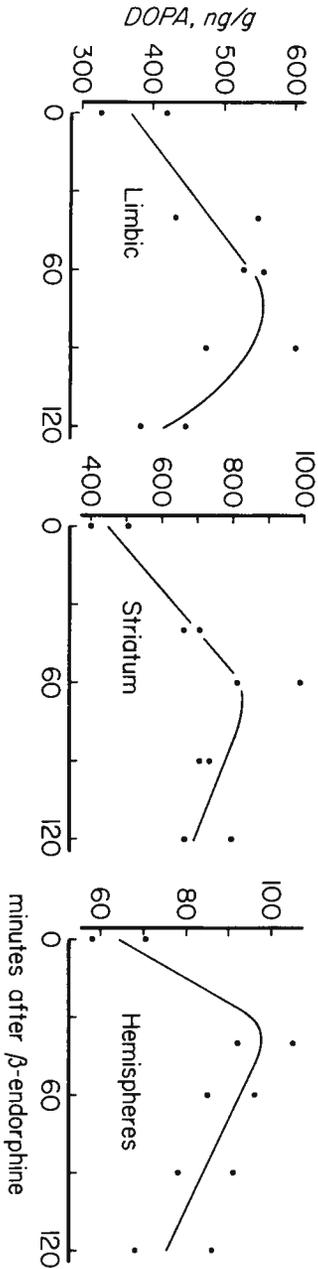


Fig. 3 Relación tiempo-efecto de una dosis única (5 μ g/rata) de beta-endorfina sobre la acumulación de DOPA tras NSD 1015 en tres regiones cerebrales de la rata. La beta-endorfina se inyectó por vía i.c.v. en el minuto cero y el NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes del sacrificio de los animales. Las ratas control recibieron i.c.v. un volumen idéntico de suero salino 10 minutos antes del NSD 1015.

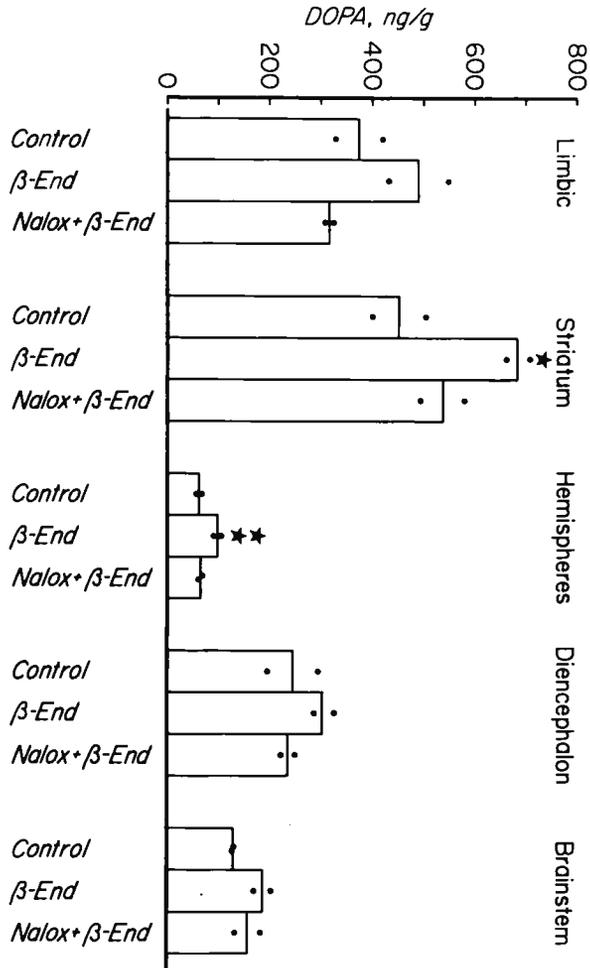


Fig. 4 Bloqueo por naloxona de los incrementos en la formación de DOPA inducidos por la beta-endorfina en diversas regiones cerebrales de la rata. La beta-endorfina (5 μ g/rata) se inyectó por vía i.c.v. 10 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.), sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron i.c.v. un volumen idéntico de suero salino 10 minutos antes del NSD 1015. La naloxona (10 mg/kg) fue administrada por vía s.c. 1 minuto antes de la beta-endorfina.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.025$ (Test-t tras análisis de varianza).

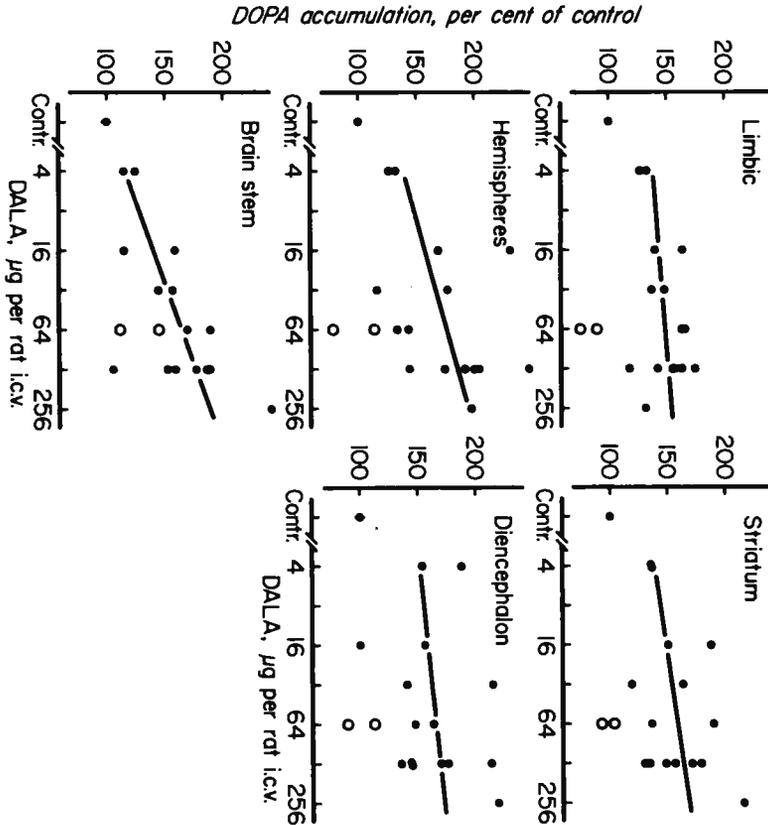


Fig. 5 Curvas dosis-respuesta para el efecto de $[D\text{-Ala}^2]$ -metionina encefalina amida (DALA) sobre la acumulación de DOPA tras NSD 1015 en diversas regiones cerebrales de la rata. El péptido opiáceo DALA se inyectó por vía i.c.v. 10 minutos antes de la administración de NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.), sacrificándose las ratas al cabo de otros 30 minutos. Los animales control recibieron i.c.v. un volumen idéntico de suero salino 10 minutos antes del NSD 1015. Los resultados se expresan en porcentajes de los valores control (100%). Media de los valores control \pm e.s.m. (n=14) en ng/g: sistema límbico del cerebro anterior: 427 ± 14 ; cuerpo estriado: 543 ± 16 ; hemisferios: 78 ± 2 ; diencéfalo: 216 ± 9 ; tronco cerebral: 125 ± 5 . Los círculos blancos representan ratas pretratadas con naloxona (10 mg/kg; s.c.) 30 minutos antes de la administración de DALA.

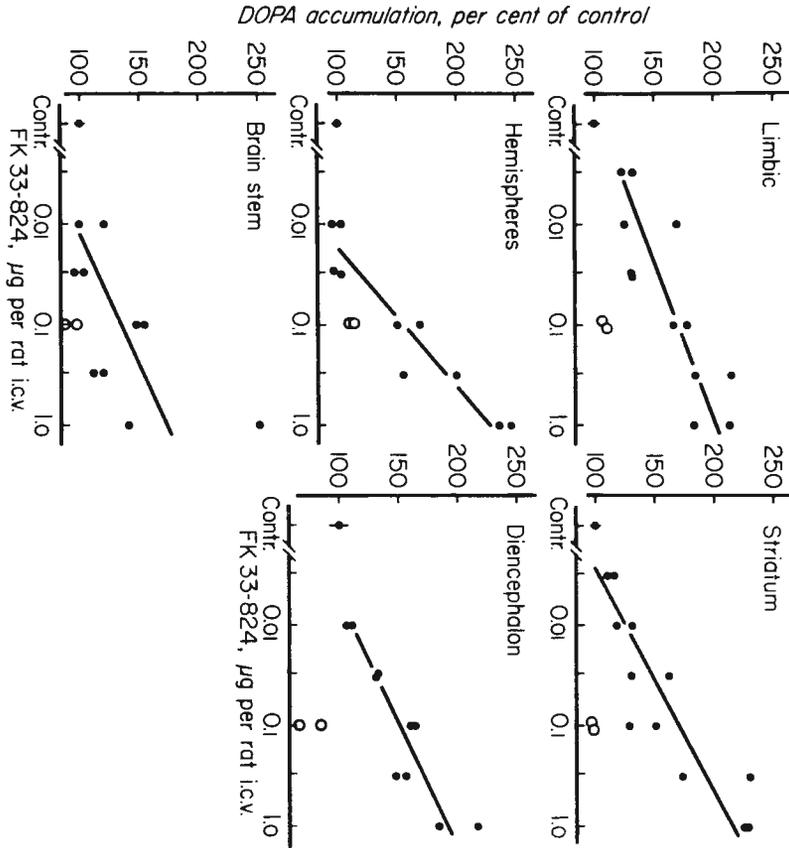


Fig. 6. Curvas dosis-respuesta para el efecto de $[D-Ala^2, MePhe^3, Met(0^5)-O^1]$ -encetalina (FE 33-824) sobre la acumulación de DOPA tras NSD 1015 en diversas regiones cerebrales de la rata. El péptido opiáceo FE 33-824 se inyectó por vía i.c.v. 10 minutos antes de la administración de NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.), sacrificándose las ratas al cabo de otros 30 minutos. Los animales control recibieron i.c.v. un volumen idéntico de suero salino 10 minutos antes del NSD 1015. Los resultados se expresan en porcentajes de los valores control (100%). Media de los valores control \pm e.s.m. (n=10) en ng/g: sistema límbico del cerebro anterior: 378 ± 16 ; cuerpo estriado: 507 ± 17 ; hemisferios: 61 ± 2 ; diencefalo: 239 ± 16 ; tronco cerebral: 131 ± 5 . Los círculos blancos representan ratas pretratadas con naloxona (10 mg/kg; s.c.) 1 minuto antes de la administración de FE 33-824.

Tabla 1. Efecto de la morfina sobre la síntesis de DOPA y 5-hidroxitriptófano (5-HTP) en diversas regiones cerebrales de la rata.

Morfina (mg/kg)	DOPA (ng/g)			5-HTP (ng/g)		
	Regiones Ímbicas	Cuerpo estriado	Resto	Regiones Ímbicas	Cuerpo estriado	Resto
Control	389 [±] 23	541 [±] 36	100 [±] 6	97 [±] 6	53 [±] 4	78 [±] 5
3	481 [±] 21 *	681 [±] 25 **	107 [±] 5	101 [±] 2	51 [±] 6	81 [±] 5
10	541 [±] 40 ***	757 [±] 32 ***	122 [±] 6	100 [±] 7	66 [±] 4	85 [±] 6
30	591 [±] 16 ***	619 [±] 20	147 [±] 15 **	109 [±] 6	62 [±] 2	89 [±] 6

La morfina se inyectó por vía i.p. 30 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.) sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron un volumen idéntico de suero salino antes del NSD 1015. Los resultados son los valores medios \pm e.s.m. de 3 determinaciones. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de una análisis de varianza seguido de un test-t. Diferencia del control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabla 2. Síntesis de monoaminas y concentraciones de tirosina y triptófano en diversas regiones cerebrales de la rata 2 horas después de la administración de morfina.

Región cerebral	DOPA(ng/g)		5-HTP(ng/g)		Tirosina(µg/g)		Triptófano(µg/g)	
	Control	Morfina	Control	Morfina	Control	Morfina	Control	Morfina
Regiones límbicas	451 [±] 23	620 [±] 44 *	113 [±] 3	122 [±] 3	22 [±] 1	28 [±] 3	5.1 [±] 0.2	5.9 [±] 0.1 **
Cuerno estriado	541 [±] 21	982 [±] 73 ***	52 [±] 3	81 [±] 12	21 [±] 1	30 [±] 3	4.9 [±] 0.1	6.0 [±] 0.3 **
Resto	101 [±] 7	131 [±] 4 *	88 [±] 7	118 [±] 4 **	21 [±] 2	36 [±] 3 *	4.0 [±] 0.2	5.0 [±] 0.1 ***

La morfina (30 mg/kg) se inyectó por vía i.p. 90 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.) sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron un volumen idéntico de suero salino antes del NSD 1015. Los resultados son los valores medios \pm e.s.m. de 3 determinaciones. Diferencias con el control: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.005 (Test-t de Student).

Tabla 3. Efecto de la naloxona sobre la síntesis de DOPA y 5-hidroxitriptofano (5-HTP) en diversas regiones cerebrales de la rata.

Naloxona (mg/kg)	DOPA (ng/g)			5-HTP (ng/g)		
	Regiones Ímbicas	Cuerpo estriado	Resto	Regiones Ímbicas	Cuerpo estriado	Resto
Control	452 [±] ₁₀	598 [±] ₄₉	93 [±] ₆	105 [±] ₂	53 [±] ₂	75 [±] ₁
10	384 [±] ₂₀ **	453 [±] ₁₃ **	97 [±] ₁	91 [±] ₇	44 [±] ₂ *	76 [±] ₇
30	379 [±] ₂₅ **	491 [±] ₂₄ *	96 [±] ₈	96 [±] ₃	48 [±] ₃	72 [±] ₄
100	384 [±] ₂₃ **	527 [±] ₃₀	86 [±] ₄	115 [±] ₄	52 [±] ₂	75 [±] ₄

La naloxona se inyectó por vía i.p. 30 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.) sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron un volumen idéntico de suero salino antes del NSD 1015. Los resultados son los valores medios \pm e.s.m. de 3-5 determinaciones. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de un análisis de varianza seguido de un test-t. Difiere del control: * p<0.05; ** p<0.025.

Tabla 4. Efecto de la naloxona (1 mg/kg) sobre la síntesis de monoaminas y las concentraciones de tirosina y triptófano en regiones lím-bicas del cerebro de rata.

	CONTROL	NALOXONA
DOPA (ng/g)	307 [±] 8	251 [±] 19 [*]
5-HTP (ng/g)	160 [±] 23	89 [±] 9 [*]
Tirosina (µg/g)	22 [±] 2	21 [±] 1
Triptófano (µg/g)	4.9 [±] 0.2	4.9 [±] 0.4

La naloxona se inyectó por vía i.p. 60 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.) sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron un volumen idéntico de suero salino antes del NSD 1015. Los resultados son los valores medios [±] e.s.m. de 6 determinaciones. Difiere del control: * p < 0.025 (Test t de Student).

Tabla 5. Efecto de la naltrexona sobre la síntesis de DOPA y 5-hidroxitriptófano (5-HTP) en diversas regiones cerebrales de la rata.

Naltrexona (mg/kg)	DOPA (ng/g)			5-HTP (ng/g)		
	Regiones Ímblicas	Cuerpo estriado	Resto	Regiones Ímblicas	Cuerpo estriado	Resto
Control	393 [±] 15	516 [±] 42	83 [±] 6	106 [±] 6	64 [±] 6	93 [±] 3
10	324 [±] 24**	386 [±] 15**	98 [±] 3	115 [±] 2	57 [±] 1	78 [±] 3*
30	308 [±] 15***	394 [±] 20**	84 [±] 3	113 [±] 3	67 [±] 2	91 [±] 3
100	381 [±] 4	437 [±] 29	95 [±] 5	101 [±] 8	62 [±] 4	84 [±] 7

La naltrexona se inyectó por vía i.p. 30 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.) sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron un volumen idéntico de suero salino antes del NSD 1015. Los resultados son los valores medios \pm e.s.m. de 3 determinaciones. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de un análisis de varianza seguido de un test-t. Difiere del control: * p<0.05; ** p<0.025; *** p<0.01.

Tabla 6. Relación tiempo-efecto de la beta-endorfina sobre la formación de 5-HTP en diversas regiones cerebrales de la rata.

Región cerebral	5-HTP (ng/g)				
	Control	40 min	60 min	90 min	120 min
Regiones límbicas	75 [±] 3	85 [±] 5	105 [±] 6*	134 [±] 3***	108 [±] 10**
Cuerno estriado	49 [±] 5	61 [±] 0	61 [±] 2	71 [±] 11	75 [±] 2 *
Hemisferios	60 [±] 13	60 [±] 5	71 [±] 11	84 [±] 4	65 [±] 4
Diencefalo	116 [±] 13	133 [±] 3	138 [±] 3	173 [±] 10	160 [±] 19 *
Tronco cerebral	139 [±] 7	164 [±] 10	179 [±] 11	197 [±] 24 *	210 [±] 10 *

La beta-endorfina (5 µg/rata) se inyectó por vía i.c.v. a distintos tiempos y el NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes del sacrificio de los animales. Los minutos indican el intervalo de tiempo entre la administración de beta-endorfina y el sacrificio de los animales. Las ratas control recibieron un volumen idéntico de suero salino (i.c.v.) 10 minutos antes del NSD 1015. Los resultados son los valores medios ± e.s.m. de 4 (control) o 2 (grupos experimentales) determinaciones. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de un análisis de varianza seguido de un test-t. Difiere del control: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Tabla 7. Efecto de la beta-endorfina sobre la concentración de tirosina en diversas regiones cerebrales de la rata.

Beta-endorfina ($\mu\text{g}/\text{rata}$)	Tiempo (min)	Regiones lámbricas	Tirosina ($\mu\text{g}/\text{g}$)				Tronco cerebral
			Cuerpo estriado	Hemisferios	Diencéfalo		
Control	-	18 ± 0.4	19 ± 2	21 ± 2	17 ± 1	16 ± 1	
2.5	40	18 ± 0.7	19 ± 2	21 ± 0.1	18 ± 0.4	14 ± 1	
5	40	18 ± 0.5	18 ± 2	20 ± 2	20 ± 4	18 ± 2	
10	40	17 ± 2	18 ± 1	21 ± 3	20 ± 3	14 ± 1	
20	40	18 ± 1	18 ± 1	22 ± 6	17 ± 1	15 ± 1	
Control	-	17 ± 2	17 ± 2	17 ± 1	19 ± 0.4	16 ± 1	
5	60	$23 \pm 1^*$	19 ± 0.2	24 ± 2	20 ± 0.6	$20 \pm 0.3^*$	
5	90	$25 \pm 1^*$	20 ± 2	$27 \pm 3^*$	$24 \pm 1^*$	$23 \pm 2^*$	
5	120	18 ± 0.4	$23 \pm 0.5^*$	22 ± 1	$22 \pm 1^*$	19 ± 1	

La beta-endorfina se inyectó por vía i.c.v. y el NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes del sacrificio de los animales. Los minutos indican el intervalo de tiempo entre la administración de beta-endorfina y el sacrificio de los animales. Las ratas control recibieron un volumen idéntico de suero salino (i.c.v.) 10 minutos antes del NSD 1015. Los resultados son los valores medios \pm e.s.m. de 4 determinaciones. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de un análisis de varianza seguido de un test-t. Difiere del control: * $p < 0.05$.

Tabla 8. Relación tiempo-efecto de la beta-endorfina sobre la concentración de triptófano en diversas regiones cerebrales de la rata.

Región cerebral	Triptófano (µg/g)				
	Control	40 min	60 min	90 min	120 min
Regiones límbicas	4.5 [±] 0.4	4.7 [±] 0.3	4.6 [±] 0.1	5.9 [±] 0.8	6.3 [±] 0.2*
Cuerpo estriado	4.5 [±] 0.4	4.9 [±] 0.1	4.6 [±] 0.1	5.5 [±] 0.5	6.3 [±] 0.2*
Hemisferios	4.6 [±] 0.2	5.1 [±] 0.5	5.3 [±] 0.6	5.8 [±] 0.4	6.5 [±] 0.1*
Diencéfalo	5.0 [±] 0.1	5.5 [±] 0.0	5.6 [±] 0.1	6.1 [±] 0.5*	6.8 [±] 0.3***
Tronco cerebral	4.3 [±] 0.3	5.0 [±] 0.4	4.9 [±] 0.4	5.5 [±] 0.7	6.1 [±] 0.2*

La beta-endorfina (5 µg/rata) se inyectó por vía i.c.v. a distintos tiempos y el NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes del sacrificio de los animales. Los minutos indican el intervalo de tiempo entre la administración de beta-endorfina y el sacrificio de los animales. Las ratas control recibieron un volumen idéntico de suero salino (i.c.v.) 10 minutos antes del NSD 1015. Los resultados son los valores medios \pm e.s.m. de 4 (control) o 2 (grupos experimentales) determinaciones. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de un análisis de varianzas seguido de un test-t. Difiere del control: * p<0.05; *** p<0.001.

Tabla 9. Efecto de las encefalinas sobre la formación de DOPA en diversas regiones cerebrales de la rata.

	DOPA (ng/g)				
	Regiones limbicas	Cuerpo estriado	Hemisferios	Diencefalo	Tronco cerebral
Control	426 [±] 16(8)	591 [±] 29(7)	71 [±] 4(8)	261 [±] 12(8)	137 [±] 6(8)
[Met ⁵]-encefalina	510 [±] 33(6) *	649 [±] 32(6)	95 [±] 6(6) **	292 [±] 27(6)	170 [±] 9(6) *
[Met ⁵]-encefalina + naloxona	431 [±] 14(2)	514 [±] 28(2)	77 [±] 2(2)	252 [±] 13(2)	213 [±] 31(2) ***
[Leu ⁵]-encefalina	603 [±] 35(4) ***	898 [±] 44(4) ***	117 [±] 10(4) ***	351 [±] 16(4) **	209 [±] 16(4) ***
[Leu ⁵]-encefalina + naloxona	361 [±] 29(2)	617 [±] 48(2)	72 [±] 9(2)	236 [±] 15(2)	133 [±] 8(2)
[Leu ⁵]- vs [Met ⁵]-encefalina	p < 0.05	p < 0.001	p < 0.05	NS	p < 0.025

Las encefalinas (500 µg/rata) se inyectaron por vía i.c.v. 10 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.) sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron i.c.v. un volumen idéntico de suero salino 10 minutos antes del NSD 1015. La naloxona (10 mg/kg) fue administrada por vía s.c. 30 minutos antes de la [Met⁵]-encefalina o por vía i.p. 60 minutos antes de la [Leu⁵]-encefalina. Los resultados son los valores medios ± e.s.m. con el número de experimentos entre paréntesis. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de una análisis de varianza seguido de un test-t. Difiere del control: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Tabla 10. Efectos de las encefalinas y de los análogos sintéticos [D-Ala²] -metionina encefalina amida (DALA) y [D-Ala², Methe⁴, Met(0)⁵-o¹]-encefalina (FK 33-824) sobre la concentración de tirosina en diversas regiones cerebrales de la rata.

	Tirosina (µg/g)				
	Regiones límbicas	Cuerpo estriado	Hemisferios	Diencefalo	Tronco cerebral
Control	20.4 [±] 0.6(18)	20.0 [±] 0.6(18)	21.3 [±] 0.6(18)	19.5 [±] 0.5(18)	18.0 [±] 0.4(18)
[Met ⁵]-encefalina	38.0 [±] 1.4(6)***	25.6 [±] 1.3(6)***	50.2 [±] 3.3(6)***	46.7 [±] 4.5(6)***	39.3 [±] 3.7(6)***
[Met ⁵]-encefalina + naloxona	41.0 [±] 1.2(2)**	26.0 [±] 4.1(2)*	49.2 [±] 6.9(2)***	51.2 [±] 3.5(2)***	47.3 [±] 4.1(2)***
[Leu ⁵]-encefalina	30.4 [±] 1.9(4)***	22.3 [±] 2.3(4)	36.1 [±] 4.2(4)***	33.6 [±] 1.6(4)***	29.4 [±] 1.7(4)***
[Leu ⁵]-encefalina + naloxona	29.9 [±] 2.3(2)***	21.3 [±] 0.2(2)	29.8 [±] 2.5(2)*	27.3 [±] 4.2(2)*	24.3 [±] 1.0(2)***
DALA	21.7 [±] 1.4(5)	19.4 [±] 0.8(5)	21.6 [±] 1.8(5)	21.7 [±] 1.7(5)	18.6 [±] 1.5(5)
FK 33-824	21.0 [±] 1.7(2)	19.8 [±] 1.7(2)	20.6 [±] 3.1(2)	19.8 [±] 1.2(2)	17.4 [±] 3.0(2)
[Met ⁵]- vs [Leu ⁵]-encefalina	p < 0.001	NS	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.005

Las encefalinas (500 µg/rata) y los análogos sintéticos DALA (125 µg/rata) y FK 33-824 (1 µg/rata) se inyectaron por vía i.c.v. 10 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.), sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron i.c.v. un volumen idéntico de suero salino 10 minutos antes del NSD 1015. La naloxona (10 mg/kg) fue administrada por vía s.c. 30 minutos antes de la [Met⁵]-encefalina o por vía i.p. 60 minutos antes de la [Leu⁵]-encefalina. Los resultados son los valores medios \pm e.s.m. con el número de experimentos entre paréntesis. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de un análisis de varianza seguido de un test-t. Difiere del control: * p < 0.05; *** p < 0.001.

Tabla 11. Efecto de las encefalinas sobre la formación de 5-hidroxitriptófano (5-HTP) en diversas regiones cerebrales de la rata.

Encefalina	5-HTP (ng/g)				
	Regiones límbicas	Cuerpo estriado	Hemisferios	Diencefalo	Tronco cerebral
Control	98 [±] 5(8)	55 [±] 2(8)	49 [±] 2(8)	135 [±] 7(8)	167 [±] 4(8)
[Met ⁵]-encefalina	109 [±] 9(6)	64 [±] 2(6) **	55 [±] 2(6) *	163 [±] 7(6) **	208 [±] 4(6) ***
[Met ⁵]-encefalina + naloxona	195 [±] 2(2)	66 [±] 2(2) *	65 [±] 1(2) ***	168 [±] 5(2) *	210 [±] 4(2) ***
[Leu ⁵]-encefalina	106 [±] 2(4)	59 [±] 2(4)	51 [±] 2(4)	175 [±] 4(4) **	199 [±] 9(4) ***
[Leu ⁵]-encefalina + naloxona	112 [±] 3(2)	53 [±] 5(2)	61 [±] 0(2) **	169 [±] 7(2) *	189 [±] 1(2) *

Las encefalinas (500 µg/rata) se inyectaron por vía i.c.v. 10 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.). sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron i.c.v. un volumen idéntico de suero salino 10 minutos antes del NSD 1015. La naloxona (10 mg/kg) fue administrada por vía s.c. 30 minutos antes de la [Met⁵]-encefalina o por vía i.p. 60 minutos antes de la [Leu⁵]-encefalina. Los resultados son los valores medios ± e.s.m. con el número de experimentos entre paréntesis. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de un análisis de varianza seguido de un test-t. Difiere del control: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Tabla 12. Efectos de los análogos de las encetalinas [\bar{D} -Ala²] -metionina encetalina amida (DALA) y [\bar{D} -Ala², Mephe⁴, Met(O)⁵-ol]-encefalina (FK 33-824) sobre la formación de 5-hidroxitriptófano (5-HTP) en diversas regiones cerebrales de la rata.

Encetalina	5-HTP (ng/g)				
	Regiones límbicas	Querpo estriado	Hemisferios	Diencefalo	Tronco cerebral
Control	89 [±] 4(16)	49 [±] 3(16)	48 [±] 2(16)	126 [±] 4(16)	147 [±] 3(16)
DALA	109 [±] 12(6) *	79 [±] 6(6) ***	63 [±] 6(6) **	155 [±] 14(6) **	178 [±] 12(6) ***
DALA + naloxona	95 [±] 3(2)	57 [±] 8(2)	51 [±] 6(2)	129 [±] 1(2)	162 [±] 6(2)
FK 33-824	100 [±] 4(8)	62 [±] 4(8) *	59 [±] 4(8) *	136 [±] 4(8)	164 [±] 4(8) *
FK 33-824 + naloxona	81 [±] 23(2)	47 [±] 1(2)	45 [±] 4(2)	117 [±] 5(2)	150 [±] 3(2)

Los péptidos opiáceos DALA (125 µg/rata) y FK 33-824 (datos conjuntos para 0.01, 0.1, 0.3 y 1 µg/rata) se inyectaron por vía i.c.v. 10 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.), sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron i.c.v. un volumen idéntico de suero salino 10 minutos antes del NSD 1015. La naloxona (10 mg/kg) fue administrada por vía i.p. 60 minutos antes del DALA o por vía s.c. 1 minuto antes del FK 33-824 (0.1 µg/rata). Los resultados son los valores medios \pm e.s.m. con el número de experimentos entre paréntesis. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de un análisis de varianza seguido de un test-t. Difiere del control: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Tabla 13. Efectos de las encefalinas y de los análogos sintéticos [D-Ala²]-metionina encefalina amida (DALA) y [D-Ala²,MetPhe⁴,Met(0)⁵-ol]-encefalina (FK 33-824) sobre la concentración de triptófano en diversas regiones cerebrales de la rata.

	Triptófano (µg/g)				
	Regiones límbicas	Cuerpo estriado	Hemisferios	Diencefalo	Tronco cerebral
Control	4.6 [±] 0.1(20)	4.7 [±] 0.1(20)	4.7 [±] 0.1(20)	4.9 [±] 0.1(20)	4.4 [±] 0.1(20)
[Met ⁵]-encefalina	5.6 [±] 0.2(6) **	5.2 [±] 0.2(6)	6.6 [±] 0.3(6) ***	6.7 [±] 0.4(6) ***	6.4 [±] 0.4(6) ***
[Met ⁵]-encefalina + naloxona	4.6 [±] 0.6(2)	5.3 [±] 0.2(2)	5.0 [±] 0.6(2)	5.8 [±] 0.4(2)	6.4 [±] 0.4(2) ***
[Leu ⁵]-encefalina	6.0 [±] 0.2(4) ***	5.4 [±] 0.2(4) *	5.9 [±] 0.2(4) **	6.7 [±] 0.2(4) ***	5.8 [±] 0.1(4) ***
[Leu ⁵]-encefalina + naloxona	5.3 [±] 0.1(2)	4.7 [±] 0.3(2)	5.8 [±] 0.2(2) *	6.1 [±] 0.4(2) *	5.5 [±] 0.4(2) *
DATA	5.6 [±] 0.6(6) **	5.7 [±] 0.5(6) ***	5.7 [±] 0.7(6) **	6.0 [±] 0.7(6) **	5.4 [±] 0.5(6) ***
DATA + naloxona	4.8 [±] 0.2(2)	5.3 [±] 0.1(2)	5.5 [±] 0.3(2)	5.3 [±] 0.6(2)	4.6 [±] 0.5(2)
FK 33-824	5.4 [±] 0.2(8) *	5.0 [±] 0.1(8)	5.3 [±] 0.1(8)	5.4 [±] 0.1(8)	4.5 [±] 0.2(8)

Las encefalinas (500 µg/rata) y los análogos sintéticos DALA (125 µg/rata) y FK 33-824 (datos conjuntos para 0.03, 0.1, 0.3 y 1 µg/rata) se inyectaron por vía i.c.v. 10 minutos antes del NSD 1015 (100 mg/kg; i.p.), sacrificándose los animales al cabo de otros 30 minutos. Las ratas control recibieron i.c.v. un volumen idéntico de suero salino 10 minutos antes del NSD 1015. La naloxona (10 mg/kg) fue administrada por vía s.c. 30 minutos antes de la [Met⁵]-encefalina o por vía i.p. 60 minutos antes de la [Leu⁵]-encefalina o DALA. Los resultados son los valores medios ± e.s.m. con el número de experimentos entre paréntesis. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de un análisis de varianza seguido de un test-t. Difiere del control: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Tabla 14. Efectos de las encefalinas y de los análogos sintéticos [D-Ala²]-metionina encefalina amida (DALA) y [D-Ala², MePhe⁴, Met(O)⁵-ol]-encefalina (FK 33-824) sobre las concentraciones de monoaminas y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el cerebro de ratas tras inhibición de síntesis.

Encefalina	Dopamina	Noradrenalina	Serotonina	5-HIAA
Control	583 [±] 32	294 [±] 28	220 [±] 9	112 [±] 3
[Met ⁵]-encefalina	476 [±] 22 *	238 [±] 15	196 [±] 8 *	167 [±] 21 *
[Leu ⁵]-encefalina	386 [±] 21 ***	241 [±] 12	187 [±] 5 **	139 [±] 2
Control	502 [±] 21	233 [±] 7	178 [±] 3	124 [±] 6
DALA	375 [±] 22 ***	176 [±] 15 **	155 [±] 6 *	131 [±] 5
FK 33-824	394 [±] 13 **	190 [±] 5 *	186 [±] 7	149 [±] 9 *

Tras la administración de benseracida (800 mg/kg; i.p.) se inyectaron por vía i.c.v. las encefalinas (500 µg/rata) o los análogos sintéticos DALA (50 µg/rata) y FK 33-824 (1 µg/rata), repitiéndose a los 25 minutos una segunda dosis que representó el 40% de la primera. Los animales fueron sacrificados 60 minutos después de la administración de benseracida. Las ratas control recibieron por vía i.c.v. un volumen idéntico de suero salino tras el pretratamiento con benseracida. Los resultados son los valores medios \pm e.s.m. de 4-5 determinaciones. Las significancias estadísticas se calcularon por medio de un análisis de varianza seguido de un test-t. Difiere del control: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Marrón

(Filosofía, Teología, Historia, Artes Plásticas, Música, Literatura y Filología)

- | | |
|---|---|
| 1 Fierro, A.:
Semántica del lenguaje religioso. | 60 Alcalá Galvé, A.:
El sistema de Servet. |
| 10 Torres Monreal, F.:
El teatro español en Francia (1935-1973). | 61 Mourão-Ferreira, D., y Ferreira, V.:
Dos estudios sobre literatura portuguesa contemporánea. |
| 12 Curto Herrero, F. Fco.:
Los libros españoles de caballerías en el siglo XVI. | 62 Manzano Arjona, M.ª:
Sistemas intermedios. |
| 14 Valle Rodríguez, C. del:
La obra gramatical de Abraham Ibn Ezra. | 67 Acero Fernández, J. J.:
La teoría de los juegos semánticos. Una presentación. |
| 16 Solís Santos, C.:
El significado teórico de los términos descriptivos. | 68 Ortega López, M.:
El problema de la tierra en el expediente de Ley Agraria. |
| 18 García Montalvo, P.:
La imaginación natural (estudios sobre la literatura fantástica norteamericana). | 70 Martín Zorraquino, M.ª A.:
Construcciones pronominales anómalas. |
| 21 Durán-Lóriga, M.:
El hombre y el diseño industrial. | 71 Fernández Bastarreche, F.:
Sociología del ejército español en el siglo XIX. |
| 32 Acosta Méndez, E.:
Estudios sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico. | 72 García Casanova, J. F.:
La filosofía hegeliana en la España del siglo XIX. |
| 40 Estefanía Álvarez, M.ª del D. N.:
Estructuras de la épica latina. | 73 Meya Llopart, M.:
Procesamiento de datos lingüísticos. Modelo de traducción automática del español al alemán. |
| 53 Herrera Hernández, M.ª T.:
Compendio de la salud humana de Johannes de Ketham. | 75 Artola Gallego, M.:
El modelo constitucional español del siglo XIX. |
| 54 Flaquer Montequí, R.:
Breve introducción a la historia del Señorío de Buitrago. | 77 Almagro-Gorbea, M., y otros:
C-14 y Prehistoria de la Península Ibérica. |

- 94 Falcón Márquez, T.:
La Catedral de Sevilla.
- 98 Vega Cernuda, S. D.:
J. S. Bach y los sistemas contrapuntísticos.
- 100 Alonso Tapia, J.:
El desorden formal de pensamiento en la esquizofrenia.
- 102 Fuentes Florido, F.:
Rafael Cansinos Assens (novelista, poeta, crítico, ensayista y traductor).
- 110 Pitarch, A. J., y Dalmases Balañá, N.:
El diseño artístico y su influencia en la industria (arte e industria en España desde finales del siglo XVII hasta los inicios del XX).
- 113 Contreras Gay, J.:
Problemática militar en el interior de la península durante el siglo XVII. El modelo de Granada como organización militar de un municipio.
- 116 Laguillo Menéndez-Tolosa, R.:
Aspectos de la realeza mítica: el problema de la sucesión en Grecia antigua.
- 117 Janés Nadal, C.:
Vladimir Holan. Poesía.
- 118 Capel Martínez, R. M.:
La mujer española en el mundo del trabajo. 1900-1930.
- 119 Pere Julià:
El formalismo en psicolingüística: Reflexiones metodológicas.
- 126 Mir Curcó, C.:
Elecciones Legislativas en Lérida durante la Restauración y la II República: Geografía del voto.
- 130 Reyes Cano, R.:
Medievalismo y renacimiento en la obra poética de Cristóbal de Castillejo.

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- 2 Mulet, A.:
Calculador en una operación de rectificación discontinua.
- 4 Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados.
- 5 Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura.
- 7 Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.
- 8 Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.
- 11 Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular.
- 19 Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética.
- 20 Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.
- 22 Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información.
- 25 I Semana de Biología:
Neurobiología.
- 26 I Semana de Biología:
Genética.
- 27 I Semana de Biología:
Genética.
- 28 Zugasti Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real.
- 29 Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias.
- 30 Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.
- 39 Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.
- 44 Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae.

- 45 Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual.
- 47 García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.
- 48 García García, A.:
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.
- 49 Trillas, E., y Alsina C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados.
- 50 Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.
- 51 Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.
- 52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.
- 55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 Carrasco Llamas, L.:
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de T_λ en el 4^{to} líquido.
- 65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 Guerra Suárez, M.ª D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 II Semana de Biología:
Botánica.
- 88 II Semana de Biología:
Zoología.
- 89 II Semana de Biología:
Zoología.
- 91 Viéitez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.
- 103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los linfocitos en la enfermedad celíaca.
- 105 Llobera i Sande, M.:
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.

- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.
- 107 Galián Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.
- 111 Obregón Perea, J. M.:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.
- 115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótrópica.
- 121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.
- 122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las Orquídeas Españolas.
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Mano-

metría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.

- 127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.
- 129 Gracia García, M.:
Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.

Serie Roja

(Geología, Ciencias Agrarias, Ingeniería, Arquitectura y Urbanismo)

- 3 Velasco, F.:
Skarns en el batolito de Santa Ojalá.
- 6 Alemán Vega, J.:
Flujo inestable de los polímeros fundidos.
- 9 Fernández-Longoria Pinazo, F.:
El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.
- 13 Fernández García, M.ª P.:
Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos.
- 15 Ruiz López, F.:
Proyecto de inversión en una empresa de energía eléctrica.
- 23 Bastarache Alfaro, M.:
Un modelo simple estático.
- 24 Martín Sánchez, J. M.:
Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo.
- 31 Zapata Ferrer, J.:
Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.
- 33 Ordóñez Delgado, S.:
Las Bauxitas españolas como mena de aluminio.
- 35 Juvé de la Barrera, N.:
Obtención de series aneuploides en variedades españolas de trigo común.
- 36 Alarcón Álvarez, E.:
Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.
- 38 Lasa Dolhagaray, J. M., y Silván López, A.:
Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera.
- 41 Sandoval Hernández, F.:
Comunicación por fibras ópticas.
- 42 Pero-Sanz Elorz, J. A.:
Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.
- 43 Santiago-Alvarez, C.:
Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de Baculovirus.

- 46 Ruiz Altisent, M.:
Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección mecánica.
- 58 Serradilla Manrique, J. M.:
Crecimiento, eficacia biológica y variabilidad genética en poblaciones de dípteros.
- 64 Farré Muntaner, J. R.:
Simulación cardiovascular mediante un computador híbrido.
- 79 Fraga González, B. M.:
Las Giberelinas. Aportaciones al estudio de su ruta biosintética.
- 81 Yáñez Parareda, G.:
Sobre arquitectura solar.
- 83 Díez Viejobueno, C.:
La Economía y la Geomatemática en prospección geoquímica.
- 90 Pernas Galí, F.:
Master en Planificación y Diseño de Servicios Sanitarios.
- 97 Joyanes Pérez, M.^a G.:
Estudio sobre el valor nutritivo de la proteína del mejillón y de su concentrado proteico.
- 99 Fernández Escobar, R.:
Factores que afectan a la polinización y cuajado de frutos en olivo (*Olea europaea* L.).
- 104 Oriol Marfá i Pagés, J.:
Economía de la producción de flor cortada en la Comarca de el Maresme.
- 109 García del Cura, M.^a A.:
Las sales sódicas, calcosódicas y magnésicas de la cuenca del Tajo.
- 112 García-Arenal Rodríguez, F.:
Mecanismos de defensa activa en las plantas ante los patógenos. Las Fitalexinas en la interacción *Phaseolus vulgaris*-*Botrytis cinerea*.
- 114 Santos Guerra, A.:
Contribución al conocimiento de la flora y vegetación de la isla de Hierro (Islas Canarias).
- 120 Vendrell Saz, M.:
Propiedades ópticas de minerales absorbentes y su relación con las propiedades eléctricas.
- 123 Pulido Bosch, A.:
Datos hidrogeológicos sobre el borde occidental de Sierra Nevada.

Serie Azul

(Derecho, Economía, Ciencias Sociales, Comunicación Social)

- 17 Ruiz Bravo, G.:
Modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos.
- 34 Durán López, F.:
Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obreros y empleados.
- 37 Lázaro Carreter, F., y otros:
Lenguaje en periodismo escrito.
- 74 Hernández Lafuente, A.:
La Constitución de 1931 y la autonomía regional.
- 78 Martín Serrano, M., y otros:
Seminario sobre Cultura en Periodismo.
- 85 Sirera Oliag, M.^a J.:
Las enseñanzas secundarias en el País Valenciano.
- 108 Orizo, F. A.:
Factores socio-culturales y comportamientos económicos.
- 124 Roldán Barber, H.:
La naturaleza jurídica del estado de necesidad en el Código Penal Español: crítica a la teoría de la exigibilidad de la conducta adecuada a la norma.
- 128 De Esteban Alonso, J.:
Los condicionamientos e intensidad de la participación política.

