

Neurobiología de los péptidos opioides

Miguel Asai*
Rafael Gutiérrez**

Summary

During the last 25 years we have attended to the formation of new and important fields in the neuroscience domain. Due to the study of neuropeptides. Virtually, the neuropeptides represent a new class of chemical transmitters, many of which could act as endocrine, amacrine or paracrine hormones. In addition, the neuropeptides were also found to influence other higher functions, including cognition and memory. The biochemical diversity in neurons has revealed the coexistence, in the same neurons, of classical small transmitters with neuropeptides. This finding offers new and promisory perspectives in the synaptic transmission.

At this time, the largest group in the neuropeptide families could be that of the opioid peptides. Endorphins could be the best studied and characterized group, because of their implications in the narcotic mechanisms of action and treatment of pain.

In this work, we recalled briefly the historical background of the discovery of enkephalins and we reviewed the biochemical characteristics implicated in the opioid peptide metabolism: the biosynthesis, release, catabolism and receptor binding. We also analyzed updated data concerning the opioid peptide physiology.

The accumulated knowledge of two decades of study of biochemistry, pharmacology, physiology and the distribution of the opioid peptides, together with the molecular biology techniques and the modern clinical diagnostic technology, such as the positron emission tomography and the nuclear magnetic resonance, promise new perspectives and possibilities of therapeutical intervention.

Resumen

En los últimos 25 años hemos asistido a la formación de nuevas e importantes líneas de investigación en el dominio de las neurociencias, producido por el estudio de los neuropéptidos, los cuales constituyen virtualmente una nueva clase de transmisores químicos. Muchos de ellos pueden funcionar como hormonas endócrinas, parácrinas y amacrinas, además de poseer la cualidad de influir en funciones como las cognoscitivas y en los factores de crecimiento. La diversidad bioquímica de las células nerviosas ha revelado la coexistencia, en la misma célula, de neuropéptidos con neurotransmisores clásicos, propiedad que ofrece nuevas perspectivas en la transmisión sináptica.

Posiblemente, el grupo de neuropéptidos más grande hasta ahora identificado y estudiado, cuya influencia es decisiva en la homeostasis celular, es el de los péptidos opioides.

En la presente revisión hacemos una breve reseña histórica del descubrimiento de las encefalinas, y ofrecemos un panorama general y actualizado sobre los procesos implicados en el metabolismo de los opioides, su síntesis, liberación, tipos de receptores y catabolismo. Para concluir, pasa-

mos revista a las diferentes funciones en las cuales pueden estar implicados.

El conocimiento acumulado en dos décadas de estudio sobre las propiedades y funciones de los péptidos opioides, aunado a las técnicas modernas en la biología molecular y de diagnóstico clínico, como la tomografía por emisión de positrones y la resonancia magnética nuclear, nos permiten avisorar un panorama prometedor de intervención terapéutica.

Introducción

El empleo de la morfina en la vida del hombre se pierde en la historia. Su capacidad para aliviar el dolor la ha colocado como el remedio más valioso, hasta ahora conocido, para evitar sus sufrimientos. Posiblemente es de Teofrasto (Siglo III a.C.), discípulo de Sócrates, de quien se tiene la primera noticia del jugo de la adormidera (33). La palabra *opio* proviene del nombre griego que significa jugo. La sustancia se obtiene del jugo de las cápsulas de adormidera *Papaver somniferum*, planta indígena del Asia Menor.

No fue sino hasta 1803 cuando el farmacéutico alemán, Federico Serturmer, aisló y describió un alcaloide del opio al que llamó *morfina*, por Morfeo, Dios griego del sueño (84,85).

Sin embargo, como ocurre a menudo, este remedio es un arma de doble filo, ya que la morfina causa adicción, problema que tuvo graves consecuencias en China durante el siglo pasado, y en este siglo en el hemisferio occidental. Por ahora se clasifica junto con su derivado diacetilado, la *heroína*, en una de las 7 familias que conforman las drogas de abuso (31) que se han convertido en problemas prioritarios de salud pública en muchos países del orbe.

La pregunta simple, importante y por demás urgente que el investigador se planteaba era: si la morfina no la produce el hombre, pero actúa por medio de la unión de receptores estereoespecíficos (descubiertos antes que el ligando endógeno), ubicados en la membrana plasmática, entonces el organismo podría fabricar su propia "morfina". El enorme potencial que representaba el poder aislar dichos compuestos, daría al hombre de ciencia la posibilidad de usar una herramienta endógena que le permitiera comenzar a explorar los mecanismos de acción de los narcóticos y las vías del dolor.

A principios de la década de los años sesenta, el doctor Hans Kosterlitz, de origen alemán, pero naturalizado inglés, propuso la existencia de sustancias endógenas con propiedades similares a la morfina, idea que fue seguida, entre otros, por el doctor. W.R. Martin (1967). El grupo del doctor Avram Goldstein (1971) desarrolló métodos muy específicos para la

* Laboratorio de Análisis Químicos.

** Laboratorio de Neurofisiología. División de Neurociencias. Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calz. México-Xochimilco, 101. San Lorenzo Huipulco 14370. México D.F.

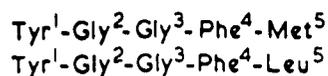
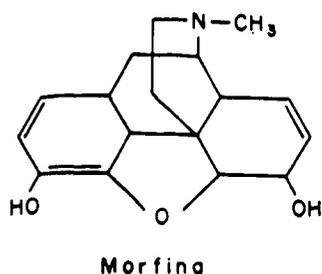
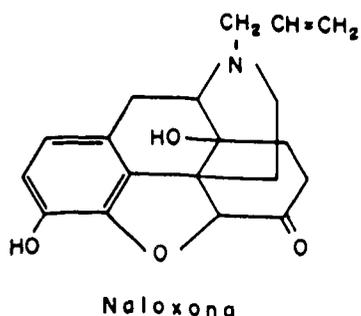


Figura 1.

detección de receptores del opio en las membranas neuronales. Este descubrimiento abrió las puertas para el estudio de los mecanismos de acción de los opiáceos. Posteriormente, se aisló el receptor estereoespecífico en los vertebrados (76). Según Goldstein, los primeros intentos en la búsqueda de los ligandos endógenos fracasaron debido a la utilización de los métodos de extracción, a los bioensayos y a los anticuerpos, suponiendo, erróneamente, que el material endógeno tenía las mismas propiedades fisicoquímicas y estructurales que la morfina.

En 1974, John Hughes, colaborador en la Universidad de Aberdeen, Escocia, del doctor Kosterlitz, logró purificar, a partir del homogenado del cerebro del cerdo, una sustancia con propiedades semejantes a la morfina, porque producía, en los ensayos biológicos sobre la vasa deferente del ratón y el plexo miéntérico del ileo del cobayo, la inhibición de las contracciones provocadas, efecto que era revertido por la naloxona, la naltrexona y el Mr-1302, antagonistas de las drogas narcóticas (44).

Simultáneamente, los grupos de los doctores Avram Goldstein, Solomon Snyder y Lars Terenius, estaban también involucrados en la elucidación de la estructura de los compuestos endógenos. El doctor Terenius orientó acertadamente la ruta de la investigación al señalar la naturaleza peptídica de los compuestos

buscados. El doctor Terenius purificó sus muestras por medio de la técnica de filtración molecular en Sephadex (cuyas fracciones se eluían en el rango menor a los 1000 Daltons de peso molecular) y logró eliminar sus efectos en los bioensayos al añadir enzimas denominadas endopeptidasas.

La tenacidad de Hughes y Kosterlitz fructificó, ya que en 1975, reportaron la secuencia de 2 pentapéptidos a los que llamaron *encefalinas* (en el cerebro), estos péptidos presentaron la siguiente secuencia (fig. 1), NH₂-Tyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Met⁵-COOH (Metionina-Enkefalina) y NH₂-Tyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Leu⁵-COOH (Leucina-Enkefalina) (45,46).

Estos autores hicieron notar que la secuencia de la metionina-encefalina (ME) estaba presente en los residuos de los aminoácidos 61-65 de la β-Lipotrofina (β-LPH), hormona aislada en 1965 por Chao Hao Li (54,55), de la glándula hipófisis de la oveja; la actividad de la β-LPH estaba asociada con una leve actividad sobre los lípidos, y durante la década de los años sesenta, no despertó mayor interés.

Por otro lado, Cox y col. (1975), Teschemacher y col. (1975), ambos del grupo de Goldstein, aislaron de la glándula hipófisis del ganado bovino y porcino, un péptido que se comportaba como la morfina. Al determinar la estructura del compuesto, al que llamaron β-endorfina, encontraron que correspondía al fragmento 61-91 de la β-LPH. La α y γ-endorfina fueron aisladas por Ling y Guillemin (1976) y correspondían a los fragmentos 61-76 y 61-77 de la β-LPH. En ese momento fue evidente que la β-LPH era el precursor de las encefalinas, sin embargo la hipótesis -muy razonable- encontró, como veremos adelante, realidades diferentes.

Inicialmente, el doctor Erick Simon propuso el nombre genérico de *endorfinas* para referirse a todos los péptidos que presentaran la secuencia común de 5 aminoácidos de la met-encefalina (inserta en la porción 61-65 de la β-LPH). En la actualidad, el término abarca a la leu-encefalina, a las dinorfinas y a los derivados de la β-endorfina.

Los términos *opioides* y *opiáceos* se utilizan (como lo haremos en el presente capítulo), el primero, para designar a los péptidos endógenos, y el segundo para designar a los ligandos exógenos, es decir, a los compuestos sintéticos.

El descubrimiento de las encefalinas trajo consigo una auténtica explosión de reportes en la literatura, en los cuales se les atribuía toda clase de propiedades; ahora la información está bien documentada y se pueden consultar en diversas revisiones (1,524,36,39,42,47,53,58,65,66,67,73,79,98).

La necesidad de encontrar fármacos con acciones similares a la morfina (sedativas, analgésicas, psicótropas, supresoras del síndrome de abstinencia), sin sus efectos colaterales (hipotermia, constricción, tolerancia, dependencia) dió lugar a toda clase de experimentos e hipótesis sobre sus posibles funciones.

En el presente capítulo, se presenta un panorama general sobre los aspectos sobresalientes de la biología básica de los péptidos opioides, con el fin de ubicar al lector en este amplio campo de la neurobiología.

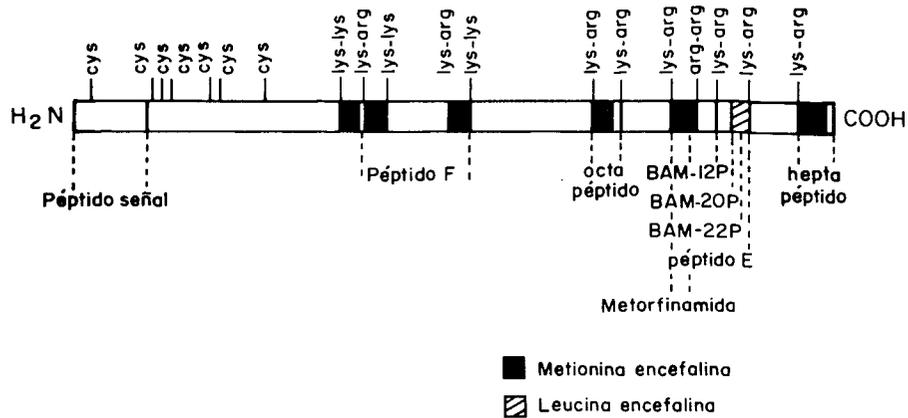


Figura 3.

Los péptidos producidos por la proencefalina A, de naturaleza opioide, se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC, desde la corteza hasta la médula espinal. La proencefalina A contiene 4 copias de met-enkefalina, 1 copia del heptapéptido met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷, 1 copia del octapéptido met-enkefalina-Arg⁶-Glu⁷-Leu⁸ y una copia de la leu-enkefalina (fig. 3).

La presencia de ME y LE en el mismo precursor de la Proencefalina A, hizo suponer que ambos péptidos podían estar en la misma célula, es decir, que ambos fueran sintetizados por igual. Sin embargo, hay neuronas que muestran inmunorreactividad a LE y no a ME. En estas neuronas, la secuencia de LE puede provenir de la expresión del gen para la prodinorfina (97).

Una característica importante de la proencefalina B o prodinorfina, es que no contiene ninguna copia de ME (sólo copias con la secuencia de la LE), cuyos productos, conocidos como dinorfinas, tienen una potencia opioide cientos de veces mayor a la met-enkefalina.

Además de estas tres grandes familias, existen otros agonistas con actividad opioide potente. Uno de ellos, descubierto en la piel de la rana *Phyllomedusa sauvagei*, es un heptapéptido denominado *Demorfina* (NH₂-Tyr-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-COOH). Este péptido es semejante a los péptidos obtenidos de la casei-

na de la leche, los caseimorfínicos, denominados *Exorfinas* (68).

Por otro lado, la *Kyotorfina* es un dipéptido (Tyr-Gly) que tiene actividad opioide probablemente debido a que promueve de manera específica, la liberación de ME (99). El tetrapéptido carboxilterminal del heptapéptido (véase proencefalina A), comparte su secuencia con un péptido de los moluscos que es excitatorio y tiene las propiedades opioides de los moluscos, la FMRF amida. Los anticuerpos desarrollados contra este péptido reconocen "un sistema opioide" en las neuronas de los mamíferos, que no corresponden con el de las tres grandes familias aquí descritas (11). El análisis filogenético de los opioides se revisa en otros dos capítulos del presente número.

En la figura 5 se muestra la distribución anatómica de los sistemas opioides en el sistema nervioso central, bajo criterios de inmunohistoquímica. Como puede apreciarse, quizás no exista ninguna estructura que contenga menos de uno de los péptidos descritos. También es pertinente mencionar que sólo se usaron anticuerpos contra los péptidos mejor conocidos, pero a juzgar por el número de péptidos que tienen acción opioide importante, los cuales se muestran en la figura 6, esta distribución podría ser más densa y más extensa.

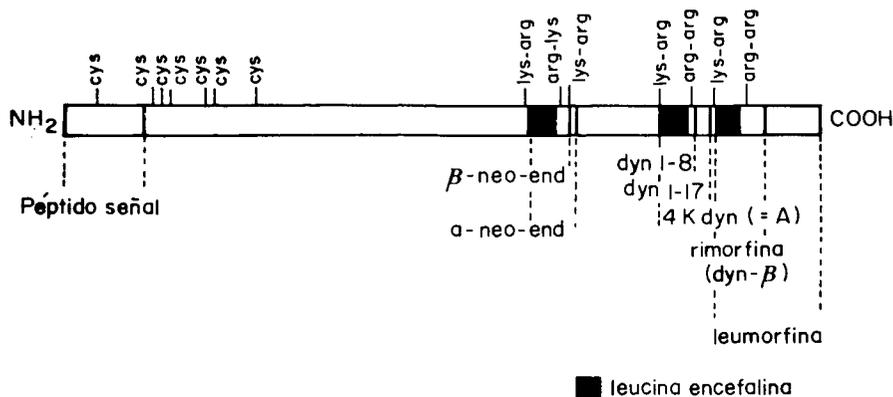
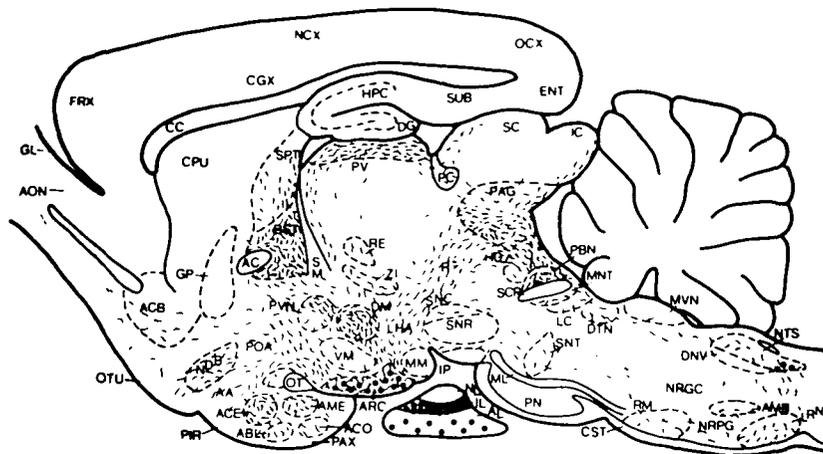
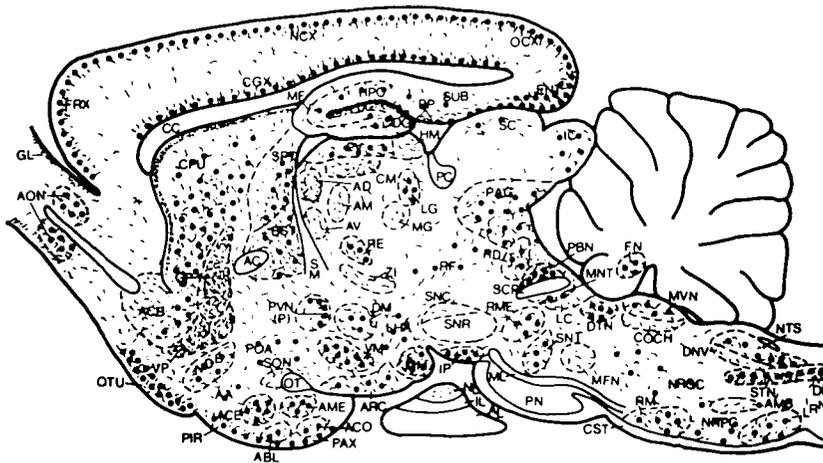


Figura 4.

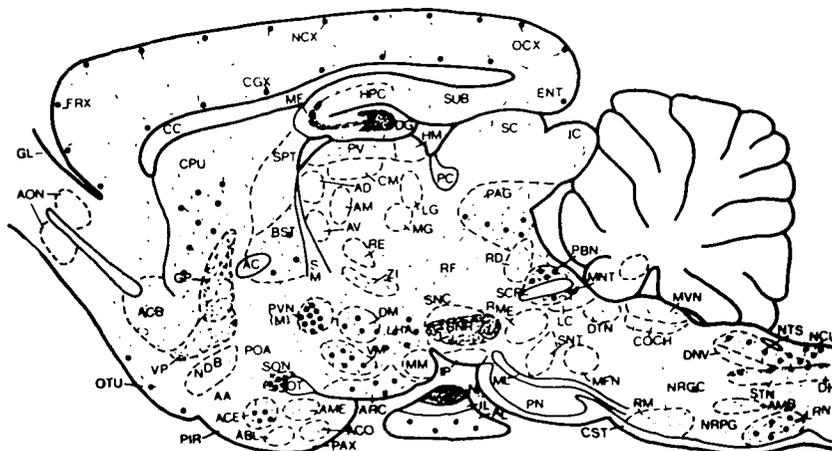
ANATOMIA DE LOS SISTEMAS OPIOIDES EN EL SNC.



PROOPIOMELANOCORTINA



PROENCEFALINA



PRODINORFINA

Figura 5. Anatomía de los sistemas opioides en el SNC.

Metabolismo

El papel de las endorfinas como neurotransmisores o neuromoduladores está apoyado por su existencia en las terminales nerviosas en forma vesiculada, y porque pueden ser liberadas por exocitosis. Las variaciones en las que se encuentran las vesículas no forman especializaciones sinápticas, por lo menos en los ganglios basales, por lo que se ha sugerido (75) que la neurotransmisión es "más difusa". Una vez liberadas, las sustancias pueden ser retiradas del espacio sináptico por tres mecanismos: difusión, degradación enzimática, y recaptura. La acetilcolina (ACh), por ejemplo, es retirada por la degradación enzimática por la acetilcolinesterasa, lo que permite que la colina sea recapturada por la neurona. Los aminoácidos transmisores son retirados del espacio sináptico por las células gliales y las neuronas; no se han reportado mecanismos de recaptura para los péptidos (75).

Además de la difusión, se lleva a cabo una proteólisis mediada por peptidasas extracelulares; estas peptidasas no son específicas en el sentido en el que la acetilcolinesterasa lo es para hidrolizar la ACh.

El metabolito de mayor concentración de la met-enkefalina, identificado en los perfusados cerebrales en experimentos realizados *in vitro*, es el tripéptido Tyr³-Gly⁴, el cual proviene de la ruptura del enlace Gly³-Phe⁴ de la enkefalina, liberando Phe-Met (34). Ambos fragmentos son biológicamente inactivos. Los estudios posteriores, realizados *in vitro*, confirmaron la existencia de una enzima capaz de romper el enlace Gly³-Phe⁴ (26,59). Esta enzima (coloquialmente conocida como "enkefalinasa"), ha recibido mucha atención por parte de los investigadores, debido a que su inhibición aumenta la respuesta analgésica al potenciar la acción de las enkefalinas (82,97). La identidad de la enkefalinasa causó confusión durante los años posteriores a su descubrimiento en el cuerpo estriado, en principio, porque se consideraba que era una enzima de localización específica en el cerebro, que metabolizaba un sólo péptido. Sin embargo, se reconocieron propiedades y actividades similares en otros tejidos, en particular en el riñón, cuya identidad

Nombre	
<i>Pre-proopiomelanocortina POMC</i>	
α-endorfina	β-LPH ₆₁₋₇₆
β-endorfina	β-LPH ₆₁₋₉₁
γ-endorfina	β-LPH ₆₁₋₇₇
<i>Pre-proencefalina A</i>	
[Met] - enkefalina	
[Leu] - enkefalina	
[Met] - enkefalina - Arg ⁶	
[Met] - enkefalina - Lys ⁶	
[Met] - enkefalina - Arg ⁶ - Phe ⁷	
[Met] - enkefalina - Arg ⁶ - Gly ⁷ - Leu ⁸	
Metorfamida	[Met] - enkefalina - Arg - Arg - Val
Péptido I	(Secuencia 1 - 40)
Péptido E	Péptido I (15 - 39)
BAM - 12P	Péptido I (15 - 26)
BAM - 20P	Péptido I (15 - 34)
BAM - 22P	Péptido I (15 - 36)
Péptido F	
Péptido B	
Amidorfina (PA 104 - 129 - NH ²)	
<i>Pre-Prodinorfina</i>	
[Leu] - enkefalina - Arg	
β - neo - endorfina	
α - neo - endorfina	
Dinorfina 1 - 32	
Dinorfina A	Dinorfina (secuencia 1 - 17)
Dinorfina B (Rimorfina)	Dinorfina (secuencia 20 - 32)
Dynorfina 1 - 8	Dinorfina (secuencia 1 - 8)
Leumorfina	
<i>Receptores</i>	
μ (mu)	
δ (delta)	
κ (Kapa)	
σ (sigma)	
ε (epsilon)	
ζ (zeta)	

Figura 6. Péptidos identificados a partir de sus precursores. (La lista de péptidos se tomó hasta el año de 1985. No se consideran los péptidos generados de la porción no opioide de la proencefalina ni de la prodinorfina).

fue rápidamente establecida tanto por el uso de inhibidores específicos, como por criterios inmunohistoquímicos (2,13,26,62,80). Ahora se conoce como la

Las abreviaciones son: AA: amígdala anterior, ABL: núcleo basolateral de la amígdala, AC: comisura anterior, ACB: núcleo *accumbens*, ACE: núcleo central de la amígdala, ACO: núcleo cortical de la amígdala, AD: núcleo anterodorsal del tálamo, AL: lóbulo anterior de la pituitaria, AM: núcleo anteromedial del tálamo, AMB: núcleo ambiguo, AME: núcleo medial de la amígdala, AON: núcleo olfatorio anterior, ARC: núcleo arcuato, AV: núcleo anteroventral del tálamo, BST: núcleo del lecho de la *stria terminalis*, CC: cuerpo calloso, CGX: corteza del cíngulo, CM: núcleo centro-medial del tálamo, COCH: núcleo coclear, CPU: caudo-putamen, CST: tracto corticoespinal, DH: médula espinal dorsal, DG: giro dentado, DM: núcleo dorsomedial del hipotálamo, DNV: núcleo motor dorsal del vago, DTN: núcleo tegmental dorsal, ENT: corteza entorrinal, FN: núcleo fastigial del cerebelo, GL: capa glomerular del bulbo olfatorio, GP: *globus pallidus*, HM: núcleo habenular medial, HPC: hipocampo, IC: colículo inferior, IL: lóbulo intermedio de la pituitaria, IP: núcleo interpeduncular, LC: núcleo de *locus coeruleus*, LG: núcleo geniculado lateral, LHA: área hipotálamica lateral, LRN: núcleo reticular lateral, MF: fibras del hipocampo, MFN: núcleo motor facial, MG: núcleo geniculado medial, MM: núcleo mamilar medio, MNT: núcleo mesencefálico del trigémino, MVN: núcleo vestibular medio, NCX: neocorteza, NL: lóbulo neural de la pituitaria, NRG: *nucleus reticularis gigantocellularis*, NRPG: *nucleus reticularis paragigantocellularis*, NTS: núcleo del tracto solitario, OCX: corteza occipital, OT: tracto óptico, OTU: tubérculo olfatorio, PAG: sustancia gris periacueductal, PAX: corteza periamigdalóide, PBN: núcleo parabránquial, PC: comisura posterior, PIR: corteza piriforme, POA: área preóptica, PP: vía perforante, PV: núcleo periventricular del tálamo, PVNM: núcleo paraventricular magnocelular, PVN: núcleo paraventricular (*pars parvocellularis*), RD: núcleo del rafé dorsal, RF: formación reticular, RM: núcleo del refé magno, RME: núcleo del rafé mediano, SC: colículo superior, SCP: pedúnculo cerebelar superior, SM: estria medular del tálamo, SNC: sustancia nigra (*pars compacta*), SNR: sustancia nigra (*pars reticulata*), SNT: núcleo sensorial del trigémino, SON: núcleo supraóptico, SPT: núcleo septal, STN: núcleo espinal del trigémino, SUB: *subiculum*, VM: núcleo ventromedial del hipotálamo, VP: pálido ventral, ZI: zona incerta. (Adaptado de H. Khachaturian, 1985. *Anatomy of the CNS opioid systems*. Trends Neurosci. 8:111-119).

ENZIMAS INVOLUCRADAS CON LA DEGRADACION DE ENCEFALINAS

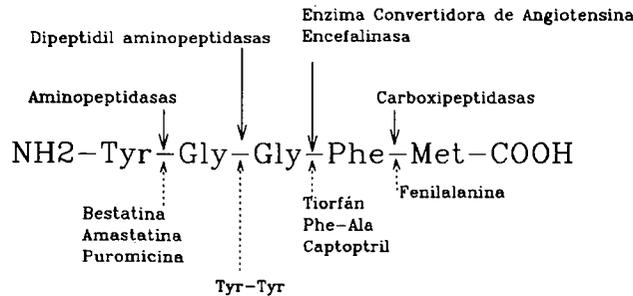


Figura 7. Enzimas involucradas en la degradación de encefalinas.

endopeptidasa 24.11 y, dentro de la clasificación enzimática, como EC 3.4.24.11. Su identidad fue confirmada por el grupo de Relton y col. (1983) al purificar hasta homogenizar las muestras cerebrales y enfrentarlas a anticuerpos monoclonales.

Los péptidos opioides pueden sufrir degradación por medio de diversas endopeptidasas que actúan al romper el enlace Tyr¹-Gly². La mayoría de este tipo de enzimas se encuentra en el citosol y, por lo tanto, es poco significativo para el metabolismo de los opioides en la sinápsis. Sin embargo, se ha reportado la presencia de amino-peptidasas en la membrana, cuya actividad es comparable a la enkefalinasas. Probablemente, la mejor conocida sea la enzima convertidora de angiotensina (ACE), formalmente, llamada peptidil dipeptidasa A, EC 3.4.15.1 (74,89).

En la figura 7 se muestran las diversas enzimas que degradan a los péptidos en diferentes regiones de la molécula, y sus respectivos inhibidores. En la figura 8 señalamos los probables mecanismos de acción de los inhibidores mejor caracterizados (82).

Receptores a los opioides

No sería sorprendente pensar en la complejidad y variedad de los receptores a opioides, toda vez que se han descrito más de 20 péptidos con actividad opioide, lo cual, en principio, implica la unión a su receptor de manera estereoespecífica. Así, encontramos ahora diferentes tipos y subtipos de receptores. Para la norepinefrina se describieron receptores alfa y beta, que ahora se subdividen en alfa-1, alfa-2, beta-1 y beta-2. También en el caso de los receptores D-1 y D-2 para la dopamina y H-1 y H-2 para la histamina. Estas nuevas clasificaciones parecen ser más la regla que la excepción, de las cuales los receptores a opioides no están exentos. En el campo de los opioides esto parece tener mayor complejidad si nos permitimos pensar que si la molécula de norepinefrina puede tener al menos 4 subtipos de receptores, ¿cuántos podrían tener potencialmente los más de 20 péptidos hasta ahora descritos?

La elucidación de los requerimientos estructurales que debían de reunir los opiáceos para producir analgesia eran muy severos y críticos, por lo tanto, duran-

te la década de los años cincuenta, se postuló la hipótesis de que los opiáceos deberían de interactuar en lugares específicos en el organismo (7,8,78). Durante esos años, el esfuerzo experimental estuvo apoyado por el uso de la N-Alilnorcodeína, el primer antagonista opiáceo descubierto (77,102), y después por la síntesis de antagonistas puros: la *naloxona* y la *naltrexona* (12), cuya capacidad para revertir la anal-

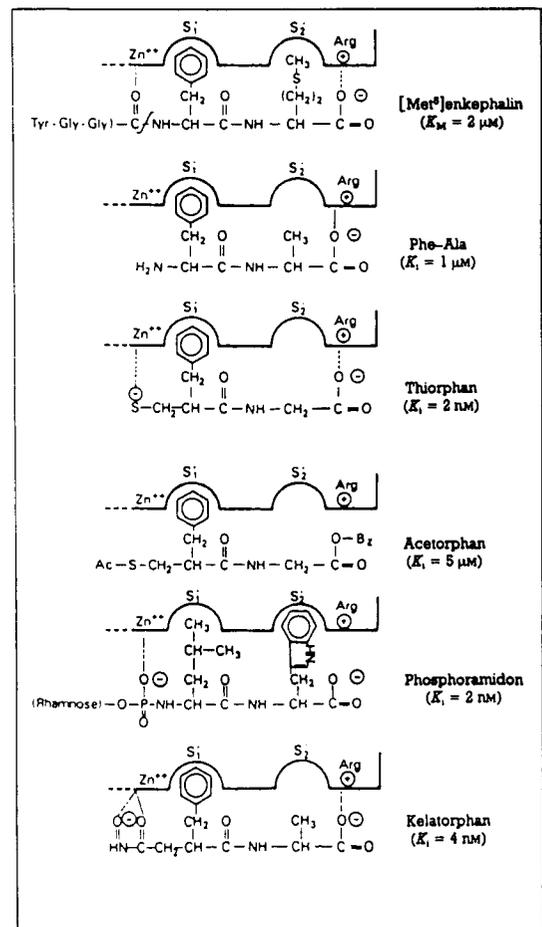


Figura 8.

gesia inducida por opiáceos, la depresión respiratoria y el coma producido por la sobredosis de morfina y heroína, señalaban la existencia de un receptor opiáceo.

Usando la modificación de un método para medir la unión estereoespecífica de los opioides en homogenizados de cerebro desarrollado, como mencionó A. Goldstein en 1971, tres laboratorios publicaron la demostración bioquímica de sitios de unión para opioides usando la ^3H -Naloxona (76), la dihidromorfina (92) y la etorfina (86). Estos sitios mostraron la misma estereoespecificidad que la observada en los estudios farmacológicos, y los compuestos no marcados inhibieron la unión con la misma potencia relativa medida en los bioensayos e *in vivo*. Varios estudios conductuales subsecuentes, al usar varios agonistas opioides, sugirieron que había más de un tipo de receptor en el SNC (28,29,60).

Martin y col. (1976), en un trabajo ahora clásico, encontraron en la preparación en perros espinales, respuestas farmacológicas a varios tipos de analgésicos narcóticos; y la imposibilidad de hacer sustituciones entre sí para evitar el síndrome de abstinencia en animales adictos, llevó a postular la existencia de por lo menos tres tipos de receptor en el SNC del perro. Estos se denominaron de acuerdo con el tipo de droga que permitió hacer tal distinción: μ para los que el agonista era la morfina, κ para los que era la cetociclazocina y σ para los que el agonista era el SKF-10047.

El receptor μ se define operacionalmente como el sitio de alta afinidad en el que los opioides producen analgesia y aumentan el tono muscular, la constipación, y la oliguria, y producen una fuerte depresión respiratoria e intensa dependencia física.

El receptor δ se define como aquel que se encuentra en los tejidos periféricos, como en el *vas deferens* del ratón (57), y en el SNC (14,15), y que muestra mayor afinidad para las encefalinas naturales que para la morfina. Los agonistas que tienen mayor afinidad por el receptor δ tienen una actividad analgésica menor, comparada con la de los μ (4,81,83). El receptor κ es en el que los opiáceos, como la cetociclazocina, producen mayor analgesia que los agonistas μ , así como efectos atáxicos y sedantes (28,61), producen menos depresión respiratoria y se presenta menor dependencia. Chavkin y col. (1982) demostraron que este receptor es altamente selectivo para la dinorfina.

Se ha propuesto que el receptor σ es el sitio en el que se median los efectos psicomiméticos y estimulantes de la N-Allylnormetazocina (SKF-10047), la ciclazocina y otros opiáceos relacionados (61,109). Los opioides σ difieren de los opioides clásicos en que producen efectos psicomiméticos en el hombre y efectos conductuales singulares en los animales (37,40). En dosis bajas producen acciones similares a las de la morfina, como analgesia (52) y acciones antagonistas, como la precipitación del síndrome de abstinencia en los sujetos adictos a la morfina (38). En dosis altas, producen una combinación de sedación, embriaguez y psicosis que no se parecen a los efectos de la morfina (29,61). La mayoría de los efec-

tos conductuales de los opioides, σ observados en animales, no se revierten con naloxona o naltrexona, que son antagonistas opioides no selectivos (91,100, 101). Se ha sugerido que el receptor σ puede no ser un receptor opioide típico ya que no muestra la clásica estereoespecificidad de un receptor opioide, como el D- y L-SKF-10047; son equipotentes y se unen a los receptores de la fenciclidina (PCP) (1).

En contraste con las acciones analgésicas de los agonistas μ , δ , κ , y ϵ , el agonista σ , SKF-10047, no es analgésico, pero si es un potente antagonista μ (61,64,91). Parece que los opioides σ interactúan con dos sitios que no son sensibles a la naloxona. Uno es el receptor a la fenciclidina o PCP/ σ , que media los efectos psicomiméticos de la PCP y las drogas relacionadas. El otro es insensible a la PCP pero es muy sensible al haloperidol y a un ligando del autorreceptor de dopamina.

Se sabe que una consecuencia de la unión de un agonista al receptor PCP/ σ es la modulación de los efectos del NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) en el SNC. El NMDA es el agonista prototipo del receptor a los aminoácidos tipo N-excitatorios. Los derivados de la PCP, los agonistas opioides σ y las benzo-f-isoquinolinas antagonizan estereoespecíficamente la excitación producida por NMDA en las neuronas espinales (3,9) y corticales (17,51,95). Las drogas tipo PCP/ σ antagonizan específicamente la liberación inducida por NMDA en las rebanadas de cerebro (87,88).

Un receptor recientemente caracterizado por el grupo del doctor Zagon, el ζ (107), fue descrito como mediador del crecimiento celular. El mismo grupo ha sumado evidencias para apoyar dicha hipótesis, por haber estudiado la ontogenia del receptor zeta en el cerebro de la rata. Los autores sugieren que el receptor zeta está principalmente relacionado con la proliferación celular en el sistema nervioso (108). En la figura 9 presentamos un resumen de los diferentes receptores de los opioides hasta ahora identificados.

Además de los agonistas puros, existen otros dos tipos de narcóticos en uso. Estos incluyen los agonistas parciales μ (buprenorfina, profadol y propiram) y los analgésicos agonistas/ antagonistas (pentazocina, ciclazocina, butorfanol, nalbufina y nalorfina) (41,61).

Los agonistas parciales en dosis bajas al receptor μ , a dosis altas son antagonistas competitivos. Esta actividad antagonista parece deberse a que tienen una tasa de disociación muy lenta del receptor μ (20). Los analgésicos con propiedades agonistas/antagonistas tienen varias afinidades por el receptor (61). Estas incluyen antagonismo a μ , agonismo para κ y agonismo parcial para el receptor σ .

Todos los agonistas μ , δ , κ y ϵ que han sido probados son analgésicos potentes. Sin embargo, esta conclusión se ve limitada por la inexistencia de un agonista δ puro (fig. 9).

El aislamiento de diferentes tipos de péptidos opioides endógenos y su clasificación en familias de proteínas precursoras han llevado a intentar relacionar estos péptidos con los distintos tipos de receptores.

Todos los péptidos relacionados con la proencefalina muestran actividad δ , desde la LE, que tiene mayor afinidad por el receptor δ , hasta el octapéptido,

Receptor	Agonistas
μ	Morfina, dihidromorfina, fentanil
δ	Dadle (D-Ala2-D-Leu5-encefalina) Dslet (d-Ser2-Leu5-Enk-Thr6)
κ	Ekc (etilciclazocina); MR-2034 [(-) - α - (1R, 5R, 9R) - 5, 9 - dimetil - 2 - (L - tetrahidrofurfuril) - 2' - hidróxi - 6,7, - benzomorfanó]
ϵ	β - endorfina
δ	SKF - 10047 (N - alilnorfenazocina) 8 - metoxiciclazocina
ζ	Met - encefalina

Figura 9. Subpoblaciones de receptores opiáceos y agonistas prototipo. (Adaptado de R. Gutiérrez, Ciencia 43:47-61, 1992).

que parece ser igualmente μ y δ . La familia de las dinorfinas muestra una selectividad similar. Las dinorfinas y las neo-endorfinas tienen mayor afinidad por los receptores κ (16), pero la dinorfina 1-8 conserva cierta afinidad por el δ (1,19), mientras que la dinorfina 1-13 es potente tanto en μ como en κ . La tercera familia, la POMC, que da lugar a la β -endorfina, es muy potente para los receptores μ y δ y al receptor ϵ , con una distribución muy restringida en el cerebro (106).

Debe tenerse en mente que la "preferencia" de un opiáceo por un tipo de receptor es un fenómeno *in vitro*, y la acción real de cualquier péptido o conjunto de péptidos dependerá del tipo de receptor que esté en la sinapsis de las neuronas peptidérgicas.

Como se ha mencionado, se ha trabajado mucho en los últimos 40 años en torno al receptor opiáceo. Sin embargo, todavía se sabe muy poco acerca de su localización y posibles funciones (fig. 10), y aún sabemos menos acerca de sus propiedades moleculares.

Localización	Posibles funciones
Espina dorsal Lámina I y II	Percepción corporal del dolor
Núcleo del tracto solitario Núcleos comisurales <i>nucleus ambiguus</i>	Reflejos vagales, depresión respiratoria, supresión de la tos, hipotensión, inhibición de la secreción gástrica.
Area postrema	Náusea y vómito
<i>Locus coeruleus</i>	Euforia
Habénula - interpeduncular	Euforia, efectos emocionales
Area pre-tectal (media y lateral del núcleo óptico)	Miosis
<i>Colliculus superior</i>	Miosis
Núcleo ventral del geniculado lateral	Miosis
Núcleos terminales, lateral, medio de la vía visual	Efectos endócrinos a través de modificaciones de la luz
Núcleo coclear dorsal Núcleo parabránquial	Euforia en conexión al <i>locus coeruleus</i>
Parte lateral del núcleo medial del tálamo, láminas externa e interna,	
Núcleo periventricular del tálamo	Percepción del dolor
Amígdala	Efectos emocionales
Caudado, putamen, <i>globus pallidus</i> , <i>núcleo accumbens</i>	Movimiento
Núcleo intersticial de la <i>stria terminalis</i>	Efectos emocionales

Figura 10. Localización y posible función de los receptores opiáceos. (Adaptado de R. Miller Pharmacol ther 12:73, 1981).

Tolerancia
 Dependencia
 Ingesta de alimentos
 Ingesta de líquidos
 Aprendizaje
 Memoria
 Funciones renales, cardiovasculares, gastrointestinales
 Termorregulación y respiración
 Sistema inmune
 Envejecimiento
 Embarazo y desarrollo
 Fisiología en el Deporte de Alto Rendimiento
 Movimiento
 Percepción del dolor
 Depresión
 Epilepsia
 Enfermedades mentales
 Cáncer

Figura 11. Areas en las cuales se ha propuesto que participan los péptidos opioides. (Adaptado de Olson y col. Peptides 10:1253-1280 1989).

res. La caracterización funcional y estructural de un receptor requiere de su purificación, de su reconstitución en una membrana que reúna propiedades fisiológicas determinadas y, por último, del aislamiento y clonación de su gene. Las diferentes propiedades fisicoquímicas de los receptores opioides, como poder solubilizarlo pero conservando sus características de unión, retrasaron su estudio molecular, pero este elusivo problema ha comenzado a ser resuelto satisfactoriamente por el grupo del doctor Christopher J. Evans (1992), que logró la clonación del receptor delta, el cual tiene una considerable homología con los receptores para la somatostatina (37%), la angiotensina (31%) y el factor quimiotáctico interleukina-8 (22%).

Por otro lado, la Tomografía por Emisión de Positrones (PET), nos permite diferenciar ahora los receptores de tipo μ y κ en el cerebro de los pacientes con epilepsia, demencia y enfermedad de Alzheimer (25, 94), y sus aplicaciones clínicas son prometedoras.

Actualmente, se reconocen diferentes tipos y subtipos de receptores opioides, pero la interrelación entre unos y otros es desconocida. Por el momento se desconoce el grado de homología que hay entre los diferentes receptores, y hay muchas preguntas importantes, como si, en realidad, los diversos tipos de receptores son producidos por diferentes genes o son derivados de uno solo, y si el procesamiento postraduccional es el responsable de modificar porciones del receptor, que una vez que se encuentra asociado a la membrana presenta afinidades diferentes por sus diversos ligandos. Indudablemente, la secuencia primaria que reporta el doctor Evans para el receptor delta, es el principio de la comprensión de su estructura, propiedades y regulación.

Función

En los años que precedieron al descubrimiento de las encefalinas, el principal esfuerzo de la comunidad científica se concentraba en el estudio de los mecanismos de acción de los narcóticos y de las vías del

dolor. Sin embargo, la extensa distribución de los péptidos en todo el Sistema Nervioso Central y Periférico, ha permitido proponer que los péptidos opioides pueden influir en diversas funciones superiores (fig. 11).

La localización de péptidos opioides en el SNC fue inicialmente descrita por criterios inmunohistoquímicos, pero muchos resultados fueron cuestionados; sin embargo, el uso de técnicas más nuevas, como la hibridación *in situ*, mostraron que su ubicación era esencialmente correcta. Estos resultados, que eran congruentes con los reportados acerca de los opioides y de los diversos neuropéptidos (41,58), facilitaron el camino para volver sobre el concepto de la colocalización (fig. 12).

El concepto de colocalización y de coliberación de neuropéptidos con transmisores clásicos, ha enriquecido poderosamente la fisiología, la bioquímica y la plasticidad neuronal. Los 2 tipos de moléculas se encuentran ubicados en diferentes lugares de almacenamiento. Los transmisores clásicos (moléculas pequeñas) se encuentran en vesículas de $\approx 500 \text{ \AA}$, y los péptidos y los transmisores, en vesículas mayores (23,63). Por lo tanto, los neuropéptidos podrán liberarse una vez que se "active" la vesícula en la cual se almacenan. La activación puede ser regulada por la frecuencia de disparo de los potenciales de acción.

La estimulación de baja frecuencia no produce la liberación de péptidos (42), solamente se activan las vesículas que contienen transmisores pequeños (6,104). Es necesario incrementar la frecuencia de disparo para que se inicie la liberación de los péptidos, los cuales serán liberados en zonas adyacentes a la zona activa de la terminal sináptica (30,96), y son capaces de difundir a distancias relativamente largas, actuando en forma de hormonas locales (22,27). Finalmente, Nicholas y col. (1990), y Kaneko y col. (1990), propusieron la existencia de un tercer transmisor del tipo del glutamato, que está presente en la terminal que contiene aminas biogénicas y neuropéptidos (50,71). Si estas hipótesis son correctas, la célula tendría propiedades plásticas que le permitirían regular su velocidad de respuesta en forma rápida, moderada y lenta, con una regulación muy fina de los transmisores que libera. La liberación basal de neuropéptidos puede ser muy pequeña o incluso inexistente, sin embargo, puede incrementarse cuando el organismo sufra algún daño o esté sometido a diferentes condiciones de estrés (42).

Los 3 sistemas de péptidos identificados se encuentran en todos los sistemas que regulan las funciones corporales, por ejemplo en el hipotálamo y en la corteza de la glándula adrenal, la cual es particularmente sensible a los péptidos derivados de la POMC, así como en el Sistema Nervioso Autónomo, en donde virtualmente todas las neuronas gástricas contienen un transmisor clásico y un péptido (42). En los últimos años se ha considerado a los péptidos opioides y a sus receptores como factores tróficos (107,108).

Los péptidos opioides identificados y caracterizados, la presencia de sus receptores estereoespecíficos, su liberación regulada, la extensa distribución en

Neurotransmisor Clásico	Péptido	Región cerebral (especie)
Dopamina	CCK Neurotensina	Mesencéfalo ventral (rata) Mesencéfalo ventral (rata)
Norepinefrina	<u>Enkefalinas</u> NPY	Locus coeruleus (gato) Medulla oblongata (rata) Locus coeruleus (rata) Locus coeruleus (rata)
Epinefrina	Vasopresina Neurotensina NPY Substancia P Neurotensina	Medulla oblongata (rata, gato) Medulla oblongata (rata) Medulla oblongata (rata) Núcleo del tracto solitario (rata)
5-HT	Substancia P TRH Substancia P+ TRH CCK <u>Enkefalina</u>	Medulla oblongata (rata, gato) Medulla oblongata (rata) Medulla oblongata (rata) Area postrema (rata)
Ach	<u>Enkefalina</u>	Oliva superior (cobayo) Espina dorsal (rata) Corteza (rata)
GABA	VIP Somatostatina CCK NPY <u>Enkefalina</u> Substancia P VIP	Tálamo (gato) Corteza, hipocampo (rata) Corteza, hipocampo (gato, mono) Corteza (gato, mono) Retina, hipotálamo, ganglios de la base (rata) Hipotálamo (rata) Formación del hipocampo (rata)
Glicina	Neurotensina	Retina (tortuga)

Figura 12 Coexistencia de neurotransmisores clásicos con péptidos en el sistema nervioso central de los mamíferos. (El criterio de coexistencia ha sido por inmunohistoquímica. Adaptado de Hokfelt y col. *Experientia* 43:768, 1987).

todo el organismo y su capacidad para alterar la respuesta de los transmisores primarios, permiten sugerir que los péptidos opioides tienen una función esencialmente comprometida con la regulación de los procesos fisiológicos y su demanda en el medio ambiente. Es probable que todo el conjunto de péptidos opioides tenga un papel multifuncional integrado a

reacciones que contribuyan a la supervivencia y control de la homeostasis del organismo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al señor. Raúl Cardoso por el material de ilustración. Este trabajo fue parcialmente apoyado por el CONACYT, México 0778-N9110 a M.A.

REFERENCIAS

- AKIL H, WATSON S J, YOUNG E, LEWIS ME, KHA-CHATURIAN K, WALDER J M: Endogenous opioids: Biology and function. *Ann Rev Neurosci*, 7:223-256, 1984.
- ALMENOFF J, ORLOWSKI A: Biochemical and immunological properties of a membrane-bound brain metalloendopeptidase: comparison with thermolysin-like kidney neutral metalloendopeptidase. *J Neurochem*, 42:151-157, 1984.
- ANIS NA, BERRY SC, BURTON NR, LODGE D: The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurons by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol*, 79:565-575, 1983.
- AUDIGIER Y, MAZARGUIL H, GOUT R, CROS J: Structure-activity relationships of enkephalin analogs at opiate and enkephalin receptors: correlation with analgesia. *Eur J Pharmacol*, 63:35-46, 1980.
- BARCHAS JD, EVANS CJ, ELLIOT GR, BERGER PA: Peptide neuroregulators: The opioid system as a model. *Yale J Bio Med*, 58:579-596, 1986.
- BEAN AJ, ROTH RH: Extracellular dopamine and neurotensin in rat prefrontal cortex *in vivo*: effects of medial forebrain bundle stimulation frequency, stimulation pattern, and dopamine autoreceptors. *J Neurosci*, 11:2694-2704, 1991.
- BECKETT AH, CASY AF: Synthetic analgesics: Stereochemical considerations *J Pharmacol*, 6:986-992, 1954.
- BECKETT AH, CASY AF, HARPER NJ: Analgesics and their antagonists: Some steric and chemical considerations. The influence of the basic group on biological response. *J Pharm Sci*, 8:874-884, 1956.
- BERRY SC, DAWKINS SL, LODGE D: Comparison of σ and κ opiate receptor ligands as excitatory aminoacids antagonist. *Br J Pharmacol*, 83:179-185, 1984.
- BLOOM FE, BATTERBER E, ROSSIER J, LING N, GUILLEMIN R: Neurons containing β -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75:1591-1595, 1978.

11. BLOOM FE: The endorphins: A growing family of pharmacologically pertinent peptides. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 23:151-170, 1983.
12. BLUMBERG H, DAYTON HG, GEORGE M, RAPAPORT DN: N-Allylnoroxymorphone. A potent narcotic antagonist. *Fed Proc*, 20:311-315, 1961.
13. BLUMBERG S, VOGEL Z, ALSTEIN M: Inhibition of enkephalin-degrading enzymes from rat brain and of thermolysin by aminoacid hydroxamates. *Life Sci*, 28:301-306, 1981.
14. CHANG KJ, CUATRECASAS P: Multiple opiate receptors: Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. *J Biol Chem*, 254:2610-2618, 1979a.
15. CHANG KJ, COOPER BR, HAZUM E, CUATRECASAS P: Multiple opiate receptors: Different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. *Mol Pharmacol*, 16:91-104, 1979b.
16. CHAVKIN C, JAMES IF, GOLDSTEIN A: Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science*, 215:413-415, 1982.
17. COAN EJ, COLLINGRIDGE GL: Magnesium ions block and N-Methyl-D-aspartate receptor-mediated component of synaptic transmission in rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 54:21-26, 1985.
18. COMB M, SEEBURG PH, ADELMAN J, EIDEN L, HEBERT E: Primary structure of the human [Met]- and [Leu]-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*, 295:663-666, 1982.
19. CORBETT AD, PATTERSON SJ, McKNIGHT AT, MAGNAN J, KOSTERLITZ HW: Dynorphin-(1-8) and dynorphin-(1-9) are ligands for the kappa subtype of opiate receptor. *Nature*, 299:79-81, 1982.
20. COWAN A, LEWIS JW, MacFARLANE IR: Agonist and antagonist properties of buprenorphine, a new antinociceptive agent. *Br J Pharmacol*, 60:537-545, 1977.
21. COX BM, OPHEIM KE, TESCHEMACHER H, GOLDSTEIN A: A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. Purification and properties. *Life Sci*, 16:1777-1782, 1975.
22. DUGGAN AW, HOPE PJ, JARROTT B, SCHAIBLE HG, FLEETWOOD WS: Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. Studies with antibody microprobes. *Neuroscience*, 35:195-202, 1990.
23. FRIED G, TEREIOUS L, HOKFELT T, GOLDSTEIN M: Evidence for differential localization of noradrenaline and neuropeptide Y in neuronal storage vesicles isolated from rat vas deferens. *J Neurosci*, 5:450-458, 1985.
24. FREDERICKSON RC: Enkephalin pentapeptides- A review of current evidence for a physiological role in vertebrates neurotransmission. *Life Sci*, 21:23-42, 1977.
25. FROST JJ: Receptor imaging by PET and SPECT-Focus on the Opiate Receptor. *J Receptor Res*, 13:1-4, 1993.
26. FULCHER IS, MATSAS R, KENNY AJ, TURNER AJ: Kidney neutral endopeptidase and the hydrolysis of enkephalin by synaptic membranes show similar sensitivity to inhibitors. *Biochem J*, 203:519-522, 1982.
27. FUXE K, AGNATI L: Two principal modes of electrochemical communication in the brain: volume versus wiring transmission. En: *Volume Transmission in the Brain: Novel Mechanisms for Neural Transmission*. Fuxe K, Agnati L (Eds). Raven Press, pp. 1-9, Nueva York 1991.
28. GILBERT PE, MARTIN WR: The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther*, 198:66-82, 1976a.
29. GILBERT PE, MARTIN WR: Sigma effects of nalorphine in the chronic spinal dog. *Drug Alc Depend*, 1:373-376, 1976b.
30. GOLDGIN D, BAYRAKTAROGLU E: Exocytosis of secretory granules. A probable mechanism for the release of neuromodulators in invertebrates neuropil. *Experientia*, 40: 1277-1280, 1984.
31. GOLDSTEIN A: In: *Addiction From Biology to Drug Policy*. Freeman WH (Eds). pp. 4, Nueva York 1994.
32. GOLDSTEIN A, LOWNEY LL, PAL BK: Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc Nat Acad Sci USA*, 68:1472-1477, 1971.
33. GOODMAN LS, GILMAN A: *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Interamericana. Cuarta edición. pp. 194, 1974.
34. GRAVES FB, LAW PY, HUNT CA, LOW HH: The metabolic disposition of radio-labelled enkephalins *in vitro* and *in situ*. *J Pharmacol Exp Ther*, 206:492-506, 1978.
35. GUBLER Y, SEEBURG P, HOFFMAN BJ, GAGE LP, UDENFRIEND S: Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature*, 295:206-208, 1982.
36. GUTIERREZ R: Neurobiología de los opioides. *Ciencia*, 43:47-61, 1992.
37. HAERTZEN CA: Subjective effects of narcotic antagonists cyclazocine and nalorphine on the addiction research center inventory (ARCI). *Psychopharmacologia*, 18:306-367, 1970.
38. HAERTZEN C A: Subjective effects of narcotic antagonists. En: *Narcotic Antagonists*. MC Braude, Harris LS, Villarreal JE (Eds). Raven Press, pp. 383-398, Nueva York 1974.
39. HEBERT E, CIVELLI O, DOUGLAS J, MARTENS G, ROSEN H: Generation of diversity of opioid peptides. *Biochemical Actions Horm*, 12:1-36, 1985.
40. HOLTZMAN SG: Narcotic antagonists as stimulants of behavior in the rat: specific and nonspecific effects. *Narcotic Antagonists*. M Braude CL, Harris S, May EL, Villarreal JE (Eds). Raven Press, pp. 371-382, Nueva York 1974.
41. HOKFELT TO, JOHANSSON O, LJUNDAHL A, LUNDBERG JM, SCHULTZBERG M: Peptidergic Neurons. *Nature*, 284:515-521, 1980a.
42. HOKFELT TO: Neuropeptides in perspective: The last ten years. *Neuron*, 7:867-879, 1991.
43. HOUDE RW: Analgesic effectiveness of the narcotic agonist-antagonists. *Br J Clin Pharmacol*, 7:297s-308s, 1979.
44. HUGHES J: Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res*, 88:295-308, 1975.
45. HUGHES J, SMITH TW, MORGAN BA, FOTHERGILL LH: Purification and properties of enkephalin- the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life Sci*, 16:1753-1758, 1975a.
46. HUGHES J, KOSTERLITZ HW, FOTHERGILL LH, MORGAN BA, MORRIS H: Identification of two related pentapeptides from the bovine brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 255:577, 1975b.
47. IMURA H, KATO Y, NAKAI Y, KAKAO K, TANAKA I, JINGAMI H, KOH T, YOSHIMASA T: Endogenous opioids and related peptides: From molecular biology to clinical medicine. *J Endocrinol*, 107:147- 157, 1985
48. JIRIKOWSKI GF, SANNA PP, BLOOM FE: mRNA coding for oxytocin is present in axons of the hypothalamo-neurohypophysial tract. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:7400-7404, 1990.
49. KAKIDANI H, FUTURANI Y, TAKAHASHI H, NODA M, MORIMOTO Y, HIROSE T, ASAI M, INAYAMA S, NAKANISHI S, NUMA S: Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo- endorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298:245-249, 1982.
50. KANEKO T, AKIYAMA H, NAGATSU I, MIZUNO N: Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res*, 507:141-154, 1990.
51. LACEY MG, HENDERSON G. Actions of Phencyclidine on rat locus coeruleus neurons *in vitro*. *Neuroscience*, 2:485-494, 1986.
52. LASAGNA L, De KORNFIELD TJ, PEARSON JW: The analgesic efficacy and respiratory effects in man of a benzomorphan "narcotic antagonist." *J Pharmacol Exp Ther*, 144:12-16, 1964.
53. LEWIS RV: Biosynthesis of the enkephalins and enkephalin-containing polypeptides. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 23:353-372, 1983.

54. LI CH: Lipotropin, a new active peptide from pituitary glands. *Nature*, 201:924, 1964.
55. LI CH, CHUNG D: Isolation and structures of a untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:1145-1148, 1976.
56. LING N, GUILLEMIN R: Morphinomimetic activity of synthetic fragments of β -lipotropin and analogues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:3308-3310, 1976.
57. LORD JH, WATERFIELD AA, HUGHES J, KOSTERLITZ H W: Endogenous opioid peptides: Multiple agonists and receptors. *Nature*, 267:495-499, 1977.
58. MADHABANANDA S, WALTER E, MILLER R, CHANG KJ, CUATRECASAS P: Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J Comp Neur*, 182:17-38, 1978.
59. MALFROY B, SWERS JP, GUYON A, ROQUES BP, SCHWARTZ JC: High-affinity enkephalin-degrading peptidase is increased after morphine. *Nature*, 276:523-526, 1978.
60. MARTIN WR: Opioid Antagonists. *Pharmacol Rev*, 19:463-522, 1967.
61. MARTIN WR, EADES CG, THOMPSON JA, HUPPLER RE, GILBERT PE: The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther*, 197:517-532, 1976.
62. MATSAS R, FULCHER IS, KENNY AJ, TURNER AJ: Substance P and (Leu)-enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:3111-3115, 1983.
63. MATTEOLI M, HAIMANN C, TORRI TF, POLAK JM, CECCARELLI B, De CAMILLIN P: Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:7366-7370, 1988.
64. METCALF G, REES JMH, WARD SJ: In vivo antagonism of analgesia and respiratory depression induced by proposed μ and κ opiate agonists. *Br J Pharmacol*, 66:473-474, 1979.
65. MILLER RJ, CUATRECASAS P: Enkephalins and endorphins. *Vitamins and Hormones*, 36:297-382, 1978.
66. MILLER RJ, PICKEL VM: The distribution and functions of the enkephalins. *J Histochem Cytochem*, 28(8):903-917, 1980.
67. MILLER RJ: Peptides as neurotransmitters: Focus on the enkephalins and endorphins. *Pharmac Ther Rev*, 126:73-128, 1981.
68. MUÑOZ D, CANDELARIO A: Exorfinas: Péptidos opioides contenidos en los alimentos y sus funciones probables. Simposio de Péptidos Opioides. XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Acapulco, Gro. México, 1993.
69. NAKANISHI S, INOUE A, NAKAMURA M, CHANG AC Y, COHEN SN, NUMA S: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature*, 278:423-427, 1979.
70. NAKANISHI S, TERANISHI Y, WATANABE Y, KAKIDANI H, NOTAKE Y, NODA M, JINGAMI H, NUMA S: Isolation and characterization of the bovine corticotropin/beta-lipotropin precursor gene. *Eur J Biochem*, 115:429-438, 1981.
71. NICHOLAS A, CUELLO A, GOLDSTEIN M, HOKFELT T: Glutamate-like immunoreactivity in *medulla oblongata* catecholamine/substance P neurons. *Neuro Report*, 1:235-238, 1990.
72. NODA M, FUTURANI Y, TAKAHASHI H, TOYOSATO M, HIROSE T, INAYAMA S, NAKANISHI S, NUMA S: Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*, 295:202-206, 1982.
73. OLSON G, OLSON R, KASTIN J: Endogenous opiates: 1988. *Peptides*, 10:1253-1280, 1989.
74. PATCHET AA, CORDES EH: The design and properties of N-carboxyalkyl dipeptide inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme. *Adv Enzymol*, 57:1-84, 1985.
75. PASANTES H, TAPIA R, SANCHEZ J: Neurobiología Celular. Fondo de Cultura Económica. 1ra. Edición. pp.167, México 1992.
76. PERT C, SNYDER S: Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science*, 179:1011-1014, 1973.
77. POHL J: Über das N-allylnorcodein, einen antagonisten des morphins. *Z Exp Pathol Ther*, 17:370-382, 1915.
78. PORTOGHESE PS: A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. *J Med Chem*, 8:609-611, 1965.
79. REID L, RUBIN PC: Peptides and central neural regulation of the circulation. *Physiol. Rev*, 67(3):725-749, 1987.
80. RELTON JM, GEE NS, MATSAS R, TURNER AJ, KENNY A J: Purification of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") from pig brain by immunoabsorbent chromatography. *Biochem J*, 215:519-523, 1983.
81. RONAI AZ, BERZETEI IP, SZENKELY JI, MIGLECZ E, KURGYIS J: Enkephalin-like character and analgesia. *Eur J Pharmacol*, 69:263-271, 1981.
82. SCHWARTZ JC, COSTENTIN J, LECOMTE JM: Pharmacology of enkephalinase inhibitors. *Trends in Pharmacol Sci*, 6:472-476, 1985.
83. SHAW JS, TURNBULL MJ, DUTTA AS, GROMLEY JJ, HAYWARD CF, STACEY GJ: A structure-activity study with enkephalin analogues: further evidence for multiple opiate receptor types. En: *Characterization and Function of Opioids*. Van Ree J M, Terenius L (Eds). Elsevier, pp. 185-195, Nueva York, 1987.
84. SERTUERNER F: Auszüge aus briefen an den herausgeber. Säure im opium. *Journal der Pharmacie*, 13: 235, 1805.
85. SERTUERNER F: Eine anders Schreiben: Nachtrag zur Charakteristik der saure im opium. *Journal der Pharmacie*, 13:236, 1805.
86. SIMON EJ, HILLER JM, EDELMAN I: Stereospecific binding of the potent narcotic 3 H-etorphine to rat brain homogenates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70:1947-1949, 1973.
87. SNELL LD, JOHNSON KM: Antagonism of N-Methyl-D-Aspartate-induced transmitter release in the rat striatum by phencyclidine-like drugs and its relationship to turning behavior. *J Pharmacol Exp Ther*, 235:50-57, 1985.
88. SNELL LD, JOHNSON KM: Characterization of the inhibition of excitatory aminoacid-induced neurotransmitter release in the rat striatum by phencyclidine-like drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 238:938-946, 1986.
89. SOFFER RL: Angiotensin converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Ann Rev Biochem*, 45:73-94, 1976.
90. SOSSIN W, SCHELLER RH: Biosynthesis and sorting of neuropeptides. *Current Opinion in Neurobiology*, 1:79-83, 1991.
91. TEAL JJ, SCHELLER RH: Discriminative effects of cyclazocine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 212:368-376, 1980b.
92. TERENIUS L: Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fractions from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol*, 33:377-384, 1973.
93. TESCHEMACHER H, OPHEIM KE, COX BM, GOLDSTEIN A: A peptide like-substance from pituitary that acts like morphine. 1. Isolation. *Life Sci*, 16:1771-1776, 1975.
94. THEODORE WH, CARSON RE, ANDREASEN P, ZAMETKIN A, BLASBERG R, LEIDERMAN D B, RICE K, NEWMAN A: PET imaging of opiate receptor binding in human epilepsy using 18 F-cyclofloxy. *Epilepsy Research*, 13:129-139, 1992.
95. THOMPSON AM, WEST DC, LODGE D: An N-methyl-aspartate receptor-mediate synapse in rat cerebral cortex: a site of action of ketamine? *Nature*, 313:479-481, 1985.
96. THURESON-KLEIN A, KLEIN RL: Exocytosis from neuronal large dense-cored vesicles. *Int Rev Cytol*, 121:67-126, 1990.

97. TURNER A J: Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays in Biochemistry*, 22:69-119, 1986.
98. UDENFRIEND S, KILPATRICK DL: Biochemistry of the enkephalins and enkephalin-containing peptides. *Arch Biochem Biophys*, 221:309-323, 1983.
99. UEDA H, FUKUSHIMA N, YOSHIHARA Y, TAKAGI H: A met-enkephalin releaser (kyotorphin)-induced release of plasma membrane bound Ca^{2+} from rat brain synaptosomes. *Brain Res*, 419:197-200, 1987.
100. VAUPEL B: Naltrexone fails to antagonize the σ effects of PCP and SKF 10,047 in the dog. *Eur J Pharmacol*, 92:269-274, 1983.
101. VAUPEL B, RISNER ME, SHANNON HE: Título: Pharmacologic and reinforcing properties of Phencyclidine and the enantiomers of N-allylnormetazocine in the dog. *Drug and Alcohol Depend*, 18:173-194, 1986.
102. VON BRAUN J: Untersuchungen über morphium-alkaloid III. Mitteilung. *Ber Deut Chem Ges*, 49:977-989, 1916.
103. WATSON SJ, AKIL H, RICHARD CW, BARCHAS JD: Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature*, 275:226-228, 1978.
104. WHIM MD, LLOYD PE: Frequency-dependent release of peptide cotransmitters from identified cholinergic motor neurons in Aplysia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:9034-9038, 1989.
105. WHITE JD, STEWART KD, DRAUSE JE, McKELVY J F: Biochemistry of peptide-secreting neurons. *Physiol Rev*, 65:553-606, 1985.
106. WOOD PL: Multiple opiate receptors: Support for unique mu, delta, and kappa sites. *Neuropharmacology*, 21:487-497, 1982.
107. ZAGON IS, GOODMAN SR, McLAUGHLIN PJ: Characterization of zeta (ζ): a new opioid receptor involved in growth. *Brain Res*, 482:297-305, 1989.
108. ZAGON I S, GIBO D M, McLAUGHLIN P M: Ontogeny of Zeta (zeta), the opioid growth factor receptor, in the rat brain. *Brain Res*, 596:149-156, 1992.
109. ZUKIN RS, ZUKIN SR: Demonstration of [3 H]-cyclazocine binding to multiple opiate receptor sites. *Mol Pharmacol*, 20:246-254, 1981.