



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

Variaciones diurnas de la metionina-encefalina y la leucina-encefalina en la amígdala del lóbulo temporal y en el cuerpo estriado de la rata.

T E S I S

Que para obtener el Título de
B I O L O G O
P r e s e n t a

ALICIA MASSARINI BASTIANI



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

I	Introducción.....	1
	a. Encefalinas.....	1
	b. Biosíntesis.....	7
	c. Liberación.....	15
	d. Receptores opiáceos.....	15
	e. Degradación de las encefalinas.....	17
	f. Distribución de las encefalinas.....	19
	g. Función de las encefalinas.....	21
	h. Variaciones diurnas del sistema opioide	24
II	Material y Métodos.....	28
III	Resultados.....	35
IV	Discusión.....	41
V	Bibliografía.....	47

I. INTRODUCCION

a) Encefalinas

El opio es un exudado lechoso proveniente de las cápsulas de la amapola Papaver somniferum. Este poderoso narcótico ha sido utilizado por el hombre desde tiempos remotos debido a sus efectos analgésicos y euforizantes.

En el año de 1806 el farmacéutico alemán Friedrich Sertürner aisló un principio activo al cual denominó morfina en alusión a Morfeo, dios griego del sueño. Poco tiempo después pudo establecerse que este alcaloide era el responsable de los efectos más notables del opio y por lo tanto mucho más efectivo que otros extractos crudos de la adormidera, por lo cual el uso de la morfina comenzó a extenderse.

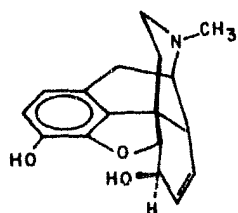
Sin embargo, pronto pudo reconocerse que este compuesto provocaba también efectos indeseables como la dependencia física o adicción; pero no fue sino hasta la mitad de nuestro siglo cuando comenzaron a ser esclarecidas las acciones fisiológicas del alcaloide (1).

En principio se observó que la morfina, al igual que las hormonas y los neurotransmisores, producía efectos altamente selectivos a concentraciones muy bajas. Este tipo de comportamiento permitía suponer que la acción era ejercida con la participación de receptores específicos, los cuales consisten en moléculas grandes que se hallan localizadas en la super-

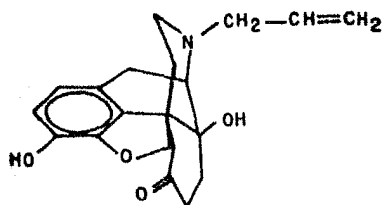
ficie externa de las células de los órganos destinatarios (2).

En el caso de los opiáceos existen diversas pruebas que apoyan el concepto de receptor:

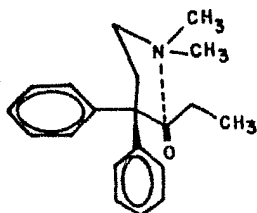
- Todos los opiáceos activos en la producción de analgesia, presentan semejanzas básicas en su estructura molecular. La mayoría de ellos ofrecen una estructura rígida en "T" con dos superficies anchas hidrófobas que forman un ángulo recto entre sí, un grupo hidroxilo capaz de formar enlaces de hidrógeno y un átomo de nitrógeno con carga positiva, que puede formar un enlace iónico. Esta estructura sugiere enlaces no covalentes con un receptor químicamente complementario (figura I).
- La mayoría de los opiáceos existen en forma de dos isómeros ópticos, moléculas idénticas en cuanto a su composición química pero que son imágenes especulares una de otra y capaces de girar el plano de la luz polarizada en diferentes direcciones. En general, tan sólo el isómero levorrotatorio puede ejercer las acciones asociadas a los compuestos opiáceos. Esta estereoespecificidad también apoya el modelo de un receptor altamente específico.
- Se ha observado que modificaciones moleculares ligeras de los opiáceos son capaces de transformar a un activador en un inhibidor, es decir, en sustancias que bloquean en forma específica las acciones analgésica y euforizante de los activa-



MORFINA



NALOXONA



METADONA

FIGURA I. ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS OPIACEOS MORFINA, NALOXONA Y METADONA.

dores, siendo su acción sumamente rápida, lo cual sugiere la posibilidad de la existencia de un receptor en común, en el que los inhibidores actuarían bloqueando el acceso a los activadores (1).

Por todas estas acciones hacía tiempo que los farmacólogos suponían que existían receptores específicos de opiáceos en el cerebro y posiblemente en otros tejidos. Sin embargo, esta idea perdía solidez porque no existen alcaloides del opio en el tejido nervioso ni en ningún otro tejido de los animales de experimentación, debido a lo cual la pregunta que inmediatamente surgía era ¿Qué significado evolutivo podía tener la existencia de receptores específicos en el sistema nervioso animal para un compuesto extraído de una planta? (3).

La posibilidad de que los opiáceos pudieran unirse a receptores de otros compuestos ya había sido estudiada, experimentando los efectos de la morfina sobre receptores de hormonas y neurotransmisores entonces conocidos, encontrándose que estos efectos, cuando aparecían, eran siempre indirectos y no explicaban la acción de los opiáceos (2).

En 1973, Snyder y Pert (4), trabajando con membranas neuronales, demostraron la presencia de receptores capaces de unirse a compuestos opiáceos con un alto grado de especificidad. Confirmada la existencia del receptor capaz de reconocer a la morfina y a otros compuestos análogos, y en la

seguridad de la inexistencia de estos alcaloides en los organismos estudiados, se vio la necesidad de buscar una sustancia parecida que sí estuviera presente de manera natural, es decir, una "morfina endógena" de naturaleza desconocida.

Dos años después, Hugues y Kosterlitz (1975) (5) reportaron la purificación, identificación y síntesis de dos pentapéptidos aislados de cerebro que reproducían las acciones de la morfina en ensayos biológicos y formaban fuertes uniones con los receptores opiáceos. Estos compuestos fueron denominados encefalinas (del griego: "en la cabeza") y presentan entre sí una configuración molecular muy semejante, difiriendo solamente en un aminoácido:

NH₂- Tir-Gli-Gli-Fen-Met-COOH

NH₂- Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-COOH

Poco tiempo después del descubrimiento de las encefalinas fue descrito un segundo sistema opiáceo. Bradbury y col. (1976) (6) aislaron un compuesto en la hipófisis del porcino que presentaba actividad opiáceo, siendo su molécula un fragmento de la beta-Lipotrofina (LPH) (7) correspondiente a los aminoácidos 61-90.

Este compuesto fue llamado beta-endorfina. Posteriormente Ling y col. (8) determinaron la estructura de otros dos compuestos del mismo grupo, aislados del extracto hipófisis-hipotálamo del porcino, que también ejercían efectos similares a los de la morfina. Estos compuestos fueron denomina-

dos alfa y gamma endorfina y correspondieron a los fragmentos 61-76 y 61-77 de la B-Lipotrofina respectivamente.

Un tercer sistema opioide fue descrito posteriormente al ser aislado en 1979 por Kangawa y col. (9) el péptido alfa-neoendorfina y por Goldstein y col. (1979) (10) el péptido Dinorfina.

Paralelamente al descubrimiento de estos sistemas endógenos, se avanzaba en el estudio de su participación en distintos procesos fisiológicos.

Al confirmarse la existencia del ligando endógeno y su receptor específico, se pensó que estas sustancias podrían desempeñar el papel de neurotransmisores. Un neurotransmisor es una sustancia química liberada por terminales nerviosos que modula la producción de impulsos en otras células nerviosas. Este tipo de compuestos para ser considerados como tales deben reunir las siguientes características:

- a) Ser sintetizados en la neurona.
- b) Estar presentes en la terminal presináptica y ser liberados en cantidades suficientes para ejercer su acción en la neurona afectada u órgano efector.
- c) Ser liberados en presencia de un estímulo despolarizante.
- d) Cuando son aplicados exógenamente en concentraciones adecuadas, su acción debe ser similar a la del transmisor liberado endógenamente.
- e) Debe existir un mecanismo de recaptura o degradación de la

sustancia neurotransmisora en el espacio sináptico (11).

En particular las encefalinas, cumplen con el conjunto de las características antes mencionadas, por lo cual han sido consideradas como neurotransmisores de sistemas neuronales específicos localizados en el cerebro, los cuales participan en la integración de la información sensorial relacionada con el dolor así como en el comportamiento emocional (3).

Por otra parte, de los compuestos opioides que han sido descritos, las encefalinas son los que presentan la más amplia distribución dentro del sistema nervioso central, encontrándose en el cerebro de los vertebrados y con una distribución concordante con la de los receptores opiáceos (12).

b) Biosíntesis

En 1975, Hugues y col. (5) reportaron que la secuencia de aminoácidos de la met-enkefalina- aunque no la de leu-enkefalina- se encontraba formando parte de un péptido ya conocido, la B-Lipotrofina (en su fragmento 61-65). A su vez, ya se sabía que esta hormona contenía la secuencia completa de la hormona beta-melanotrofina (B-MSH) (7).

Poco después, Bradbury y col. (6) al estudiar el fragmento 61-90 de la B-LPH, informaron que este péptido tenía actividad analgésica y afinidad por los receptores opioides. Este compuesto, que fue llamado beta-endorfina, se interpretó entonces como un posible precursor de la met-enkefalina.

Posteriormente Ling y col. (1975) (8) aislaron a la alfa-endorfina y a la gamma-endorfina (fragmentos 61-76 y 61-77) de la B-LPH), demostrando a su vez que ambos neuropéptidos presentaban actividad morfomimética y contenían en su extremo inicial a la met-enkefalina.

En 1977, Mains y col. (13) encontraron que la secuencia de la B-LPH así como la de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y la de la MSH aparecían a su vez en una misma proteína de aproximadamente 31.000 daltones de peso molecular, denominando al nuevo precursor hallado como Pro-opio-melanocortina.

Sin embargo, la idea de que las enkefalinas podían producirse a partir de las endorfinas entró en contradicción con los hallazgos de Bloom y col. (1977) (14) quienes encontraron que las enkefalinas y las endorfinas se hallaban localizadas en poblaciones neuronales diferentes.

Para fines de 1979, se develó la existencia de otros dos posibles precursores para la met-enkefalina, aislados de médula adrenal por Stern y col. (15): el péptido tríptico adrenal (Tir-Gli-Gli-Fen-Met-Lis) y el heptapéptido adrenal (Tir-Gli-Gli-Fen-Met-Arg-Fen).

Al mismo tiempo, Kangawa y col. (9) identificaron un péptido que podría estar actuando como precursor de la leu-enkefalina: la alfa-neoendorfina (Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-Arg-Lis-Arg) y Goldstein y col. (10) aislaron de hipófisis el trideca-

péptido dinorfina 1-13 (Leu-encefalina-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lis-Leu-Lis). Ninguno de estos péptidos formaban parte de la secuencia de las endorfinas. Posteriormente pudo establecerse, a partir de investigaciones de Kakidani y col. (16), que este conjunto de péptidos provenían de un precursor común que fue denominado Proencefalina B.

Más recientemente los grupos de Udenfriend y col (15, 17, 18, 19) y Matsuo y col. (20), caracterizaron a partir de médula adrenal de bovino un gran número de péptidos de diferentes pesos moleculares que van de 5300 a 30000 daltones y presentan dentro de su estructura de una a cinco moléculas de encefalinas.

Se pensó entonces que estos péptidos eran el producto del procesamiento de una molécula precursora, aunque la secuencia completa de ésta aún no se había podido determinar.

Finalmente Noda y col. (21) pudieron secuenciar completamente la Proencefalina A de médula adrenal de bovino a partir de procedimientos de ingeniería genética, encontrando que esta molécula está constituida por 263 aminoácidos y tiene un peso molecular de 29786 daltones. A partir del descubrimiento de esta secuencia pudo determinarse que la molécula precursora (Proencefalina A) contiene cuatro copias de met-encefalina y una copia de leu-encefalina, además de un heptapéptido (met-encefalina-Arg-Fen) y un octapéptido

(met-enkefalina-Arg-Gli-Leu). Cada péptido está seguido por dos residuos de aminoácidos básicos (Lis-Lis; Lis-Arg; Arg-Arg) excepto en el caso del heptapéptido. Estos residuos sirven como señal de procesamiento para liberar cada uno de los diferentes componentes.

Poco después de la determinación de la secuencia de la proencefalina de la médula adrenal de bovino, Comb et al. (22), reportaron la clonación de la proencefalina de la médula adrenal humana. La estructura de los dos precursores presenta un alto grado de homología y el número de moléculas de enkefalinas contenidas en ambos es el mismo.

En síntesis, hasta la fecha han sido descritos tres sistemas opioides:

- El sistema cuyo precursor es la proencefalina A, de la cual se originan cuatro moléculas de met-enkefalina, una de leu-enkefalina, una de heptapéptido y una de octapéptido (figura II).
- El sistema de la proencefalina B, a partir de la cual se sintetizan alfa y beta neoendorfina, dinorfina y rimorfina (Estos péptidos contienen la secuencia de la leu-enkefalina en la porción NH_2 terminal) (figura III).
- El sistema de la pro-opio-melanocortina que contiene a la B-LPH. Esta hormona da origen a la B-endorfina la cual es precursora de la alfa y gamma endorfinas (La alfa, beta y gamma endorfinas contienen en sus primeros cinco aminoácidos

la secuencia de la met-enkefalina) (figura IV).

Actualmente se considera como el más importante en la producción de las enkefalinas al sistema de la proenkefalina A, al entender que la pro-opio-melanocortina, si bien presenta la secuencia de la met-enkefalina no puede considerarse como su precursor, ya que su localización en el sistema nervioso no coincide con la distribución regional de los receptores para enkefalinas ni con la presencia de enzimas específicas para el procesamiento de estos pentapéptidos.

El proceso por el cual el precursor Proenkefalina A da origen a las enkefalinas y otros péptidos que contienen enkefalinas dentro de sus moléculas, se ha sugerido que se lleva a cabo mediante enzimas semejantes a la tripsina y la carboxipeptidasa B (19). Estas dos enzimas se han encontrado en los gránulos cromafines de la médula adrenal y presentan una actividad óptima a pH_5 , el cual es similar al pH interno de los gránulos cromafines que fluctúa entre 5.2 y 5.6 (23, 24).

La tripsina, para liberar los compuestos activos, actúa rompiendo la unión de los pares de aminoácidos básicos que se encuentran dentro de la molécula precursora a los lados de las enkefalinas y del octapéptido. Mientras la carboxipeptidasa B rompe la parte carboxílica terminal de las moléculas en las que ha actuado la tripsina (25).

FIGURA II

PREPROENCEFALINA A

1 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 AMINO-ACIDOS

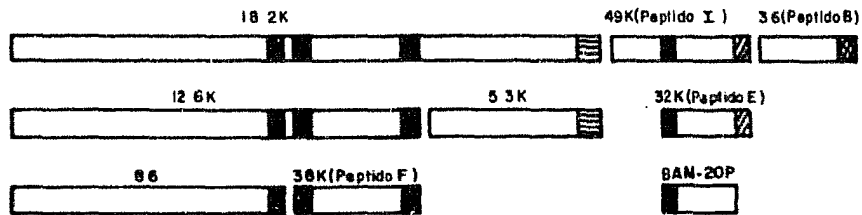
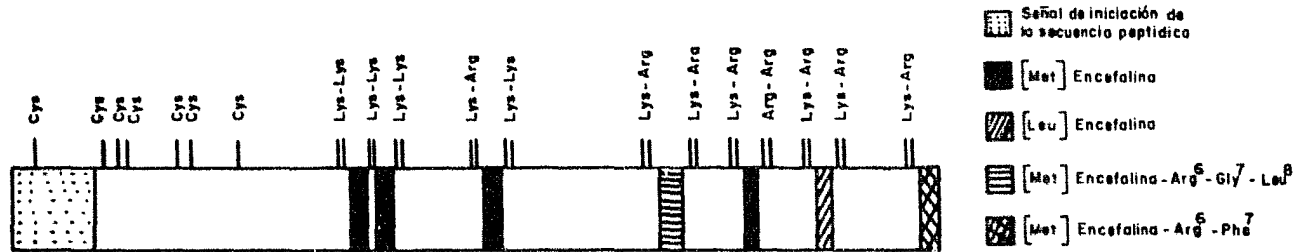


FIGURA III

PROENCEFALINA B



α - NEO-ENDORFINA



β - NEO-ENDORFINA



DINORFINA - 32



DINORFINA RIMORFINA



DINORFINA₁₋₈

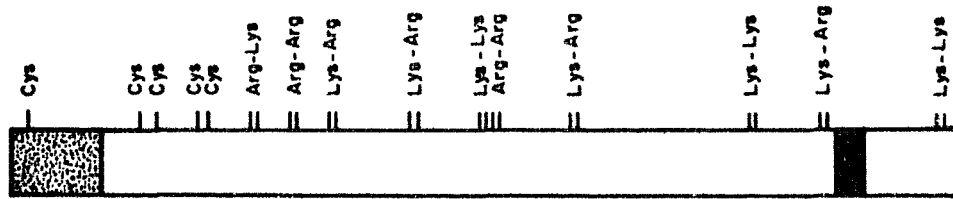


POSIBLE SEÑAL DE LA SECUENCIA DEL PEPTIDO

[LEU] ENCEFALINA

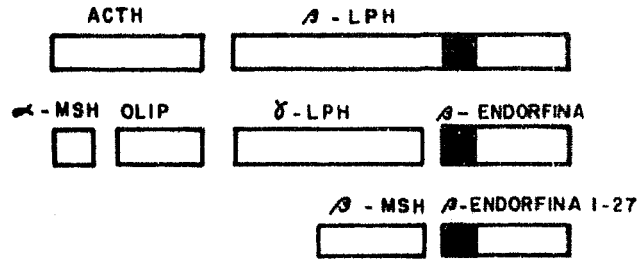
FIGURA IV

PRO-OPIOMELANOCORTINA



 POSIBLE SEÑAL DE LA SECUENCIA DEL PEPTIDO

 [Met] ENCEFALINA



c) Liberación

La liberación de un compuesto biológicamente activo de las terminales nerviosas, constituye una fuerte evidencia del papel fisiológico de ésta como sustancia neurotransmisora.

Los estudios de los mecanismos de liberación de las encefalinas en el sistema nervioso se han llevado a cabo en preparaciones sinaptosomales así como en cortes de cerebro (26, 27) y han indicado que éstas se liberan mediante estímulos despolarizantes de potasio o veratridina así como que este proceso es calcio dependiente (Esta liberación no se produce en un medio carente de calcio).

Bayon y col. (28) demostraron que ambas encefalinas se liberan de cortes de globus pallidus de rata por estímulo despolarizante de potasio, observando además que la met-encefalina se degrada más rápidamente que la leu-encefalina.

d) Receptores opiáceos

Como ya se expuso, uno de los requerimientos básicos para considerar a un compuesto como neurotransmisor es que existan receptores para esa sustancia.

En el caso de los opioides, la presencia de estos receptores fue demostrada en 1973 por Snyder y Pert (4).

Sin embargo, los opiáceos endógenos y las drogas análogas a la morfina ejercen un amplio rango de efectos farmacológicos, por lo que se supuso que existía una población

heterogénea de receptores opiáceos. Actualmente esta idea ha sido reafirmada clasificándose a los receptores opiáceos en cuatro tipos denominados mu (29), delta (30), Kappa (31) y sigma (32). Esta clasificación está basada en los efectos de una gran variedad de drogas narcóticas probadas en preparaciones de médula adrenal de perro.

En particular se ha sugerido la selectividad de las encefalinas por un tipo de receptor. Snyder y col. (30) proponen que la met-enkefalina podría ser el ligando endógeno específico para los receptores de tipo mu y la leu-enkefalina para los receptores delta.

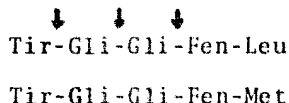
En cuanto a la localización de los receptores, su distribución regional resulta coincidente con la de las encefalinas (12). Se encuentran principalmente en la vía paleoespinotalámica del dolor, la cual es un área relacionada con la transmisión del dolor difuso, crónico y menos localizado. También se les localiza en estructuras como el cuerpo estriado, el hipotálamo y la amígdala. Esta última estructura pertenece al sistema límbico, es decir, a un grupo de regiones que son mediadoras del sistema emocional y están relacionadas con cierto tipo de epilepsias. En el interior de la médula espinal los receptores opiáceos se localizan en la sustancia gelatinosa (2).

e) Degradación de las encefalinas

Todo neurotransmisor, para tener una acción precisa debe ser rápidamente degradado o recapturado una vez que ha ejercido su función sobre el receptor específico.

En el caso de las encefalinas, se ha observado que poseen tres sitios susceptibles de inactivación:

- La unión Tir-Gli, la cual es hidrolizada por las aminopeptidasas
- La unión Gli-Gli, en la que actúa la encefalinasa B (33)
- La unión Gli-Fen cuya hidrólisis es catalizada por la encefalinasa A (34).



El sitio de acción de las aminopeptidasas fue determinado incubando tejido cerebral que contenía met-encefalina y leu-encefalina con esta enzima. En estas condiciones se observó que se encontraba tirosina libre en el medio y el pentapéptido era inactivado (35). Posteriormente pudo determinarse que en realidad existían dos tipos de aminopeptidasas: una de ellas se encuentra unida a la membrana (36) y la otra es soluble (37). La enzima soluble, que ha sido hasta ahora la más estudiada, se purificó a partir de cerebros de rata (38), chongo (37), bovino (36) y humano (39), y su peso molecular oscila entre 62 kdaltones y 100 kdaltones para las diferentes especies. La especificidad de esta enzima ha sido demostrada para las b-naftilaminas, tripéptidos, dipéptidos y encefala-

linas. Una característica importante es que a medida que aumenta el tamaño molecular del sustrato, disminuye la actividad de la enzima; debido a lo cual al actuar sobre alfa o gamma endorfina lo hace con un 30% de la velocidad con la que actúa sobre las encefalinas, siendo este valor del 5% para el caso de la B-endorfina (39).

La acción de las aminopeptidasa puede ser inhibida por varias sustancias, entre las cuales se cuentan la puromicina (37), la bestatina (37), la bacitracina (39), la amestatina y los reactivos sulfhidrilos (40).

La enzima que actúa hidrolizando la unión Gli-Gli, se conoce con el nombre de encefalinasa B y su estructura corresponde a una dipeptidil aminopeptidasa.

Esta enzima fue aislada a partir de cerebro de rata (41) y el 90% de su actividad se da en condiciones de solubilidad.

La tercera enzima que interviene en la degradación de ambas encefalinas es la encefalinasa A. Actualmente se le considera como la enzima inactivadora específica de estos pentapéptidos a partir de varias evidencias, principalmente su distribución regional en el cerebro la cual es coincidente con la de los receptores opiáceos (42).

La encefalinasa A se purificó de membranas celulares a partir de cerebro de rata (40) aunque también se le ha localizado en pulmones, riñón, glándulas salivales y testículos donde presenta gran actividad.

Debido a que su actividad es similar a la de la enzima convertidora de la Angiotensina (ACE) (43), ambas actúan rompiendo la unión Gli-Fen, durante mucho tiempo se pensó que era la misma enzima. Actualmente se conoce que estos dos compuestos presentan notables diferencias relacionadas con su distribución regional y sus mecanismos de acción (44).

La actividad de la encefalina A puede ser inhibida mediante la acción de dipéptidos y tripéptidos (45), tiorfán (46), tioles (41), agentes quelantes, barbitúricos (47) y bacitracina (48).

f) Distribución de las encefalinas

El sistema de neuropéptidos más ampliamente distribuido es el de las encefalinas. El mapeo para la determinación de su localización se ha efectuado mediante la implementación de técnicas de inmunohistoquímica, comprobando que las encefalinas se encuentran en múltiples sistemas neuronales en el cerebro (49) y sistema nervioso periférico, incluida la retina (50), en las células cromafines de la médula adrenal (51), neurohipófisis (52), células de los ganglios simpáticos (53) y mucosa intestinal de varias especies animales.

Especialmente se localizan en áreas en las que las endorfinas están ausentes o se encuentran en pequeñas cantidades;

su distribución coincide con la de los receptores opiáceos y se encuentran como interneuronas más que constituyendo vías largas (2).

También ha podido detectarse la presencia de encefalinas en los cuerpos celulares mediante la inhibición del transporte axonal utilizando colchicina.

La concentración de estos compuestos resulta muy variable dependiendo de la región que se analice, de este mismo modo fluctúa también la relación existente entre met-enkefalina y leu-enkefalina la cual va de uno a diez según el área (3).

En particular, en el sistema nervioso central, las regiones de localización de fibras encefalinérgicas y terminales incluyen: (54)

- En cerebro anterior: septum lateral, núcleos centrales de la amígdala, área CA2 del hipocampo, ciertas regiones de la corteza, cuerpo estriado, núcleos basales de la ganglia subthalámicus e hipotálamo, incluyendo eminencia media, tálamo y subtálamo.
- En cerebro medio: núcleo interpedicularis, sustancia gris periacueductal y formación reticular.
- En cerebro posterior: Núcleo parabraquialis, locus coeruleus, núcleos del rafe, núcleos cocleares, núcleos del tracto solitario, núcleos espinales del nervio trigémino, núcleos motores de ciertos nervios craneales, núcleos comisurales y formación reticularis.

En médula espinal se encontraron encefalinas en sustancia gelatinosa.

En cuanto al sistema nervioso periférico, se han localizado encefalinas en elementos neuronales periféricos, principalmente en ganglios entéricos (55), en la pared intestinal de varias especies incluido el hombre, en el plexo mesentérico (células endócrinas de la mucosa gastrointestinal y ganglios mesentéricos superior e inferior) (51).

4) Función de las encefalinas

Las encefalinas parecen intervenir en varios aspectos del metabolismo hormonal.

Estos péptidos aumentan la liberación de la prolactina, hormona secretada por la hipófisis anterior. Este efecto se debe a una inhibición de la dopamina en el hipotálamo.

También se ha observado que modifican la liberación de la hormona luteinizante, aumentando su secreción.

Por otra parte estos neuropéptidos intervienen en el metabolismo de dos hormonas secretadas en la parte anterior de la pituitaria: la ADH o vasopresina y la oxitócina. Recientemente se ha sugerido que sería la met-encefalina la que actúa sobre la secreción de oxitócina y la leu-encefalina y sus productos los que actuarían sobre la vasopresina (3).

En el sistema nervioso su papel pareciera ser el de neurotransmisores. De acuerdo al esquema tradicional, se plan-

tea que las fibras encargadas de conducir los estímulos dolorosos a la cuerda espinal utilizan como neurotransmisor a la sustancia P.

Estas señales dolorosas pueden ser bloqueadas, sin embargo, por el sistema neuronal encefalinérgico (56).

De este modo, se ha definido que una de las funciones principales de las encefalinas sería actuar como neurotransmisores inhibitorios del dolor a partir de su acción sobre las neuronas trasmisoras de este tipo de estímulos.

Belluzi (57) y Buscher (58) entre otros, encontraron que la leu-encefalina y la met-encefalina inducen analgesia de vida corta en la prueba de Tail-Flick* (59), al ser inyectadas en ratas en los ventrículos laterales en dosis de 100 y 200^{µg} y que estos efectos son totalmente revertidos por Naloxona (2mg/Kg). También observaron que al inyectar 10 mg/kg de morfina el efecto producido es de mayor potencia y duración que el provocado por las encefalinas, lo cual se atribuye a que éstas últimas sufren degradación por las enzimas cerebrales tales como aminopeptidasas o encefalinasas (36).

Por otra parte, el bloqueo producido por la naloxona puede tomarse como una indicación específica de que las encef-

* Tail-Flick- Prueba experimental para cuantificación de analgesia en la que se aplica calor radiante en la cola del animal y el efecto analgésico es medido como latencia en el movimiento de la cola así como en el registro encefalográfico característico del dolor.

linas inducen analgesia por activación de los receptores opiáceos (57, 58).

Posteriormente Frenk y col. (60) reportaron efecto analgésico en ratas tratadas con 200 μ g de met-enkefalina, administrada por inyección intracerebral directamente en la sustancia gris periacueductal, un área del cerebro medio cuya participación en la inhibición del dolor es muy conocida.

Por otro lado, debido a su localización en los ganglios basales, se ha relacionado también a las encefalinas con la actividad locomotora (1).

También se demostró que estos péptidos participan en el proceso epiléptico, ya que al ser inyectados intraventricularmente en ratas, son capaces de producir un registro electroencefalográfico característico de la actividad epiléptica en estructuras como el septum, el cuerpo estriado, el hipocampo (61) y el núcleo dorsal del tálamo (60).

Se ha observado que varios modelos experimentales de epilepsia modifican el contenido de encefalinas en el cerebro de la rata.

Hong y col. (62, 63) encontraron un incremento de la met-enkefalina después de varios electrochoques convulsivos y con el tratamiento de fármacos convulsivantes como el ácido kafínico y la isoniazida (64). Con el Kindling eléctrico amigdalino Vindrola y col. (1981) (65) reportaron un aumento de los niveles de ambas encefalinas 24 horas después de crisis

generalizadas repetidas.

Estos efectos también se presentaron en varias estructuras cerebrales de ratas sometidas al Kindling farmacológico con PTZ (66).

En trabajos recientes de Vindrola y col. (67) se mostró que los niveles de met-enkefalina posteriores a las crisis repetidas inducidas por el Kindling con PTZ se mantenían permanentemente elevados aunque este hecho no se observa en el caso de los niveles de leu-enkefalina.

La alteración de los niveles de ambas enkefalinas en animales epileptizados que han presentado crisis repetidas, así como la permanencia de niveles elevados para la met-enkefalina sugieren fuertemente la participación de estos pentapéptidos tanto en el desarrollo de las crisis como en el establecimiento del fenómeno epiléptico como patología crónica.

h) Variaciones diurnas del sistema opioide

En 1977, Frederickson y col. (68) reportaron un ritmo diurno en la respuesta analgésica de la morfina en ratones. También observaron un efecto similar en la respuesta hiperalgésica de la naloxona. En ambos casos se registró una mayor actividad durante la fase oscura. Además observaron que los animales sin tratamiento presentaban también un aumento en la latencia de los saltos con la prueba de analgesia de la plancha caliente. Con base en estos resultados los autores sugieren

que este cambio en la respuesta analgésica se puede deber a cambios en las concentraciones de los compuestos opioides.

Este mismo grupo de investigación, en 1979 decidió analizar la actividad opioide en el cerebro total de ratones utilizando el bioensayo de la vasa deferente. Conjuntamente midieron las concentraciones de met-enkefalina y de leu-enkefalina a las 7.30 hs y a las 15.30 hs en animales sin tratamiento. Estos autores encontraron un aumento en la actividad opioide durante la tarde, sin embargo, los niveles de met-enkefalina y de leu-enkefalina no difirieron significativamente.

Estos datos sugirieron que el incremento de la actividad opioide podría atribuirse al aumento en la concentración de otros compuestos opioides (69).

En 1981, Naber y col. describieron un aumento en la actividad de los receptores opiáceos durante la fase oscura (70).

Przewlocki en 1983 reportó que la dinorfina presentaba un ritmo diurno en el hipotálamo y en la glándula hipófisis. En la primera estructura observó un aumento del péptido durante la fase de oscuridad, mientras que en la segunda la máxima concentración aparece en la fase de luz (71).

Estos autores suponen que en general todo el sistema opioide puede estar integrado a un reloj biológico.

En 1983, el grupo de Kerdelhue (72) estudió la concentración de la B-endorfina en varias estructuras cerebrales

y en la glándula hipófisis encontrando los siguientes resultados: en la hipófisis intermedia se observó una variación bifásica con valores elevados a las 12 hs y a las 21 hs, mientras que en el lóbulo anterior de la hipófisis encontraron un ritmo circadiano monofásico con un pico de mayor concentración a las 21 hs. No se manifiestan ritmos circadianos en el área preóptica, tálamo, sustancia gris central, caudado, sustancia nigra, amígdala y septum. Por el contrario, se manifestó un ritmo circadiano muy marcado en médula oblongata, el cerebelo y el bulbo, todas estas estructuras con un pico de mayor concentración durante la fase de oscuridad.

Kelvin y col. (73) analizaron las concentraciones de met-enkefalina y leu-enkefalina en la médula espinal y en la médula adrenal de ratas durante un periodo de 24 hs.

En ambas estructuras la met-enkefalina presentó un ritmo circadiano con un pico de mayor concentración a las 24 hs. en la medula espinal y a las 4 hs. en la médula adrenal. Los cambios de la leu-enkefalina fueron muy diferentes ya que en la médula espinal aumenta a las 8 hs. y disminuye a las 20 hs. En la médula adrenal presenta un pico de máxima concentración a las 12 hs.

Por otra parte Shanks y col. en 1981 no encontraron ningún cambio de los niveles plasmáticos de la met-enkefalina en humanos a lo largo de las 24 hs. (74).

La mayoría de estos autores relacionaron los cambios de los compuestos opioides con respecto a la respuesta analgésica. Sin embargo, se sabe que éstos participan en otros procesos fisiológicos o fisiopatológicos cuyo desenvolvimiento está relacionado con la presencia de ritmos circadianos. Un ejemplo de ello lo constituye la epilepsia, donde se ha demostrado que la actividad convulsiva en animales de experimentación es mayor durante la fase de oscuridad.

En relación con esto, la morfina presenta una mayor actividad convulsivante durante la noche.

Como parte de un proyecto en el que se pretende esclarecer la participación de las encefalinas en el proceso epiléptico, se decidió medir las concentraciones de met-encefalina y leu-encefalina en la amígdala y en el cuerpo estriado de animales control a diferentes horas de un ciclo de 24 horas, con el objeto de examinar si existían o no ritmos circadianos para cada pentapéptido en las estructuras referidas. Se eligieron estas regiones debido a que la met-encefalina sufre un cambio permanente en la amígdala después de un proceso epiléptico, no ocurre así en el caso del cuerpo estriado. Sin embargo, esta última estructura presenta modificación de los niveles de encefalinas como producto de una crisis epiléptica (66, 67).

II. MATERIALES Y METODOS

En el curso de la presente investigación se utilizaron ratas Wistar macho con un peso promedio de 200 a 250 gramos a las que se mantuvo en un cuarto con temperatura y luz controladas ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, con 12 horas de iluminación comenzando a las 6 a.m.). Los animales se mantuvieron con comida y agua ad libitum. Estos se inyectaron con solución salina por vía intraperitoneal una vez cada 24 horas (entre 10 y 12 a.m.) durante 10 días, dividiéndolos en grupos de 6 a 7 ejemplares cada uno.

Dieciseis días después de la última inyección, se sacrificó un grupo cada 4 horas a partir de las 8 a.m.

Los animales fueron sacrificados por decapitación. El cerebro fue removido inmediatamente y enfriado a 4°C durante 2 minutos. Se disecaron la amígdala y el cuerpo estriado, los cuales se congelaron en hielo seco.

El estriado se disecó de acuerdo al procedimiento descrito por Glowinski e Iversen (75) y la amígdala de acuerdo al procedimiento de Engel y col. (76).

Las estructuras disecadas fueron pesadas e incubadas en 6 volúmenes de ácido clorhídrico 0.1 normal a 92°C durante 15 minutos, se enfriaron en hielo, se homogeneizaron y se centrifugaron a 50000 xg., durante 45 minutos a 4°C .

El sobrenadante se purificó por cromatografía de adsorción utilizando columnas de amberlita XAD-2 a una velocidad de flujo de 0.5 mililitros por minuto. El proceso cromatográfico

tográfico abarca los siguientes pasos:

- Una vez aplicada la muestra se lava con 20 ml. de HCl 0.1 N, 40 ml. de agua y finalmente se eluye con 20 ml. de metanol al 100%.
- Se evapora a sequedad con aire y se resuspende con 2 ml. de agua destilada.

La cuantificación de met-enkefalina y de leu-enkefalina se realizó mediante radio-inmunoanálisis. Los anticuerpos utilizados para este fin fueron obtenidos de conejos Nueva Zelanda después de la inmunización con los péptidos acoplados a BSA con glutaraldehído (65). El conjugado se preparó disolviendo 0.5 mg del pentapéptido y 1 mg de BSA en 200 μ l de Buffer fosfato 0.1 Molar a pH 7.4, a los que luego se adicionaron 10 μ l de glutaraldehído al 5% y una traza de enkefalina radioactiva.

La solución fue incubada a temperatura ambiente por 30 minutos.

La mezcla de la met-enkefalina se diluyó con Buffer fosfato 0.1 Molar y se almacenó a -20°C . La solución de la leu-enkefalina se cromatografió en una columna de Sephadex G-25, se eluyó con Buffer fosfato 0.1 Molar y se colectó el pico correspondiente al volumen muerto.

El material correspondiente en cada caso se emulsificó con igual volumen de adyuvante de Freund completo y se inmunizó cada conejo por inyección subcutánea de 1 ml de esta

mezcla. La inmunización se repitió cada cuatro semanas y los animales fueron sangrados dos semanas después de cada inyección.

Las diluciones de cada anticuerpo (antimet-encefalina 1: 2100; antileu-encefalina 1: 850), se incubaron con 0.25 pmol de ^3H met-encefalina y ^3H leu-encefalina y con soluciones estándares o muestra de tejidos en 500 μl de Buffer fosfato 0.1 Molar a pH 7.4 que contenía 0.1% de gelatina 0.02% de azida sódica y 0.9% de NaCl.

Después de una incubación de 24 horas a 4°C, la ^3H encefalina unida al anticuerpo se separó de la libre mediante el agregado de 0.2 ml de solución de carbón activado al 1.5% que contiene 0.15% de dextrán. Las muestras se ensayaron por triplicado.

El anticuerpo para la leu-encefalina presentó el siguiente pensamiento: 5.9% con met-encefalina, 1.4% con dinorfina (1-13) y menos de 0.01% con alfa, beta y gamma endorfina (Gráfica I).

El anticuerpo para la met-encefalina mostró 100% de cruzamiento con met(O)-encefalina, 0.3% con leu-encefalina y menos de 0.01% con met-encefalina, arginina⁶. Leu-encefalina-arginina⁶, dinorfina (1-13), alfa, beta y gamma endorfina (Gráfica II).

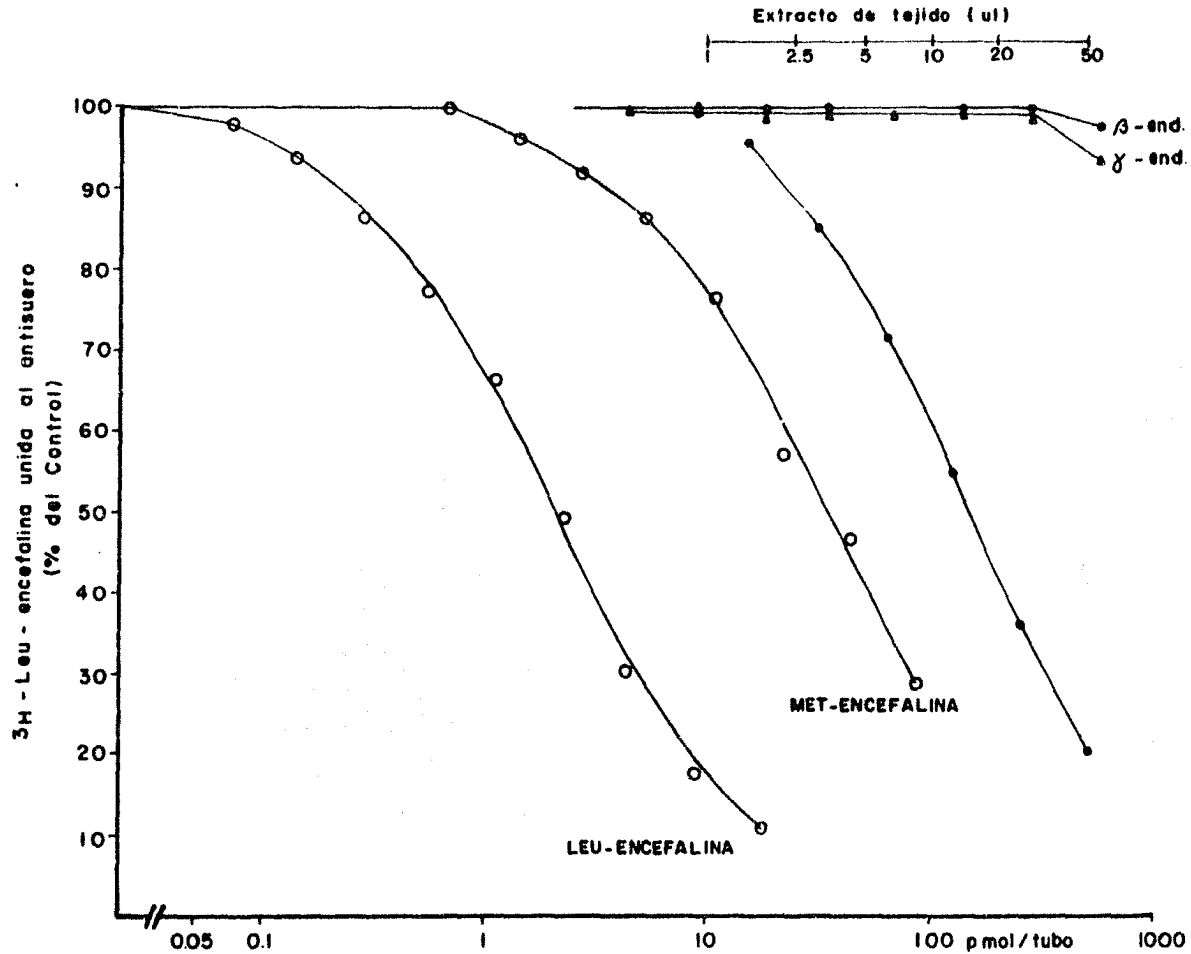
El contenido de cada encefalina se expresó en pmol de inmunorreactividad (IR) para encefalina por gramo de peso.

La leu-encefalina se cuantificó directamente de los eluatos de cromatografía de adsorción. En cambio para medir la met-encefalina las muestras fueron oxidadas con el siguiente procedimiento:

Una alícuota del eluato se incubó con un μmol de peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente durante 16 horas; se evaporó a sequedad con aire y se resuspendió en agua.

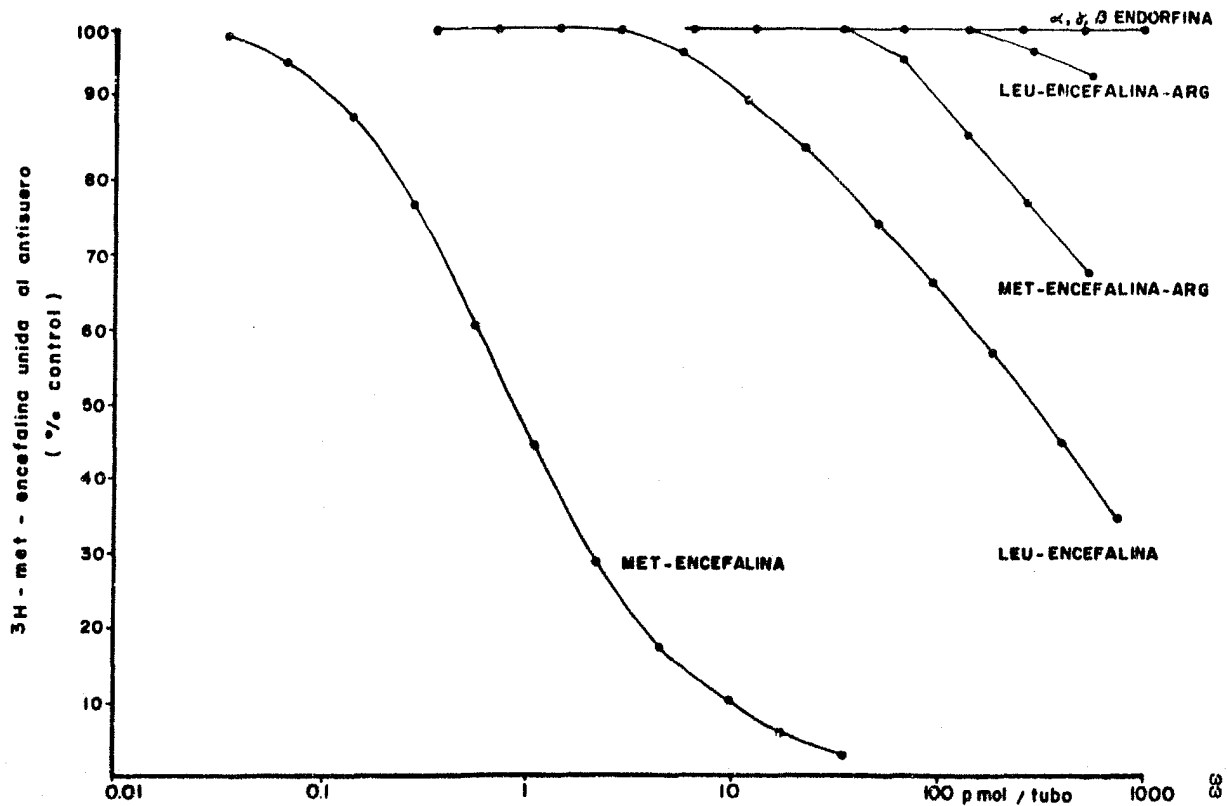
Para el análisis de los resultados se utilizó la prueba estadística del análisis de varianza o prueba de "F".

GRAFICA I
RADIOINMUNOANALISIS PARA LEUCINA - ENCEFALINA



GRAFICA II

RADIOINMUNOANALISIS PARA METIONINA - ENCEFALINA



Gráfica I: Radioinmunoanálisis para Leucina-encefalina
Antisuero a una dilución 1:850. La reactividad cruzada con Metionina-encefalina es de 5.9%, con dinorfina (1-13) 1.4% y menos de 0.01% con alfa, beta y gamma endorfina.

Gráfica II: Radioinmunoanálisis para Metionina-encefalina
Antisuero a una dilución 1:2100. La reactividad cruzada con Leucina-encefalina es de 0.3% y menor de 0.01% con Metionina-encefalina Arg6, Leucina-encefalina Arg⁶, alfa, beta y gamma endorfina.

III. RESULTADOS

Como se mencionó en la introducción, el estudio de estos animales inyectados con solución salina forma parte de un proyecto donde se analiza el ritmo diurno de las encefalinas en animales tratados con pentilene-tetrazol (PTZ). Debido a ello se hizo una valoración conductual de acuerdo a los criterios propuestos por Ito y col. (77), observándose que en estas ratas no se presenta ninguna manifestación relacionada con el proceso epiléptico.

En la Gráfica III se muestran los datos obtenidos para la met-encefalina en el cuerpo estriado, en los diferentes periodos analizados. El pentapéptido presentó la mayor concentración en el grupo de los animales sacrificados a las 8 a.m., posteriormente los valores fueron disminuyendo a lo largo del día, alcanzando la concentración más baja en la fase de oscuridad a las 24 hrs. A las 4 a.m. la concentración vuelve a subir a valores cercanos a los de las 8 a.m.

El análisis estadístico utilizando el ensayo de "F", muestra que el cambio diurno sufrido por este péptido es estadísticamente significativo.

En la gráfica IV se representan los datos correspondientes a la met-encefalina en la amígdala. En esta estructura los niveles más bajos se observaron a las 8 a.m., aumentando progresivamente para alcanzar un pico de máxima concentración durante la fase oscura, a las 24 horas. A las 4 a.m. los valores del pentapéptido vuelven a decaer hasta valores cercanos a los de las 8 a.m.

La aplicación del ensayo de "F" mostró que este cambio es estadísticamente significativo.

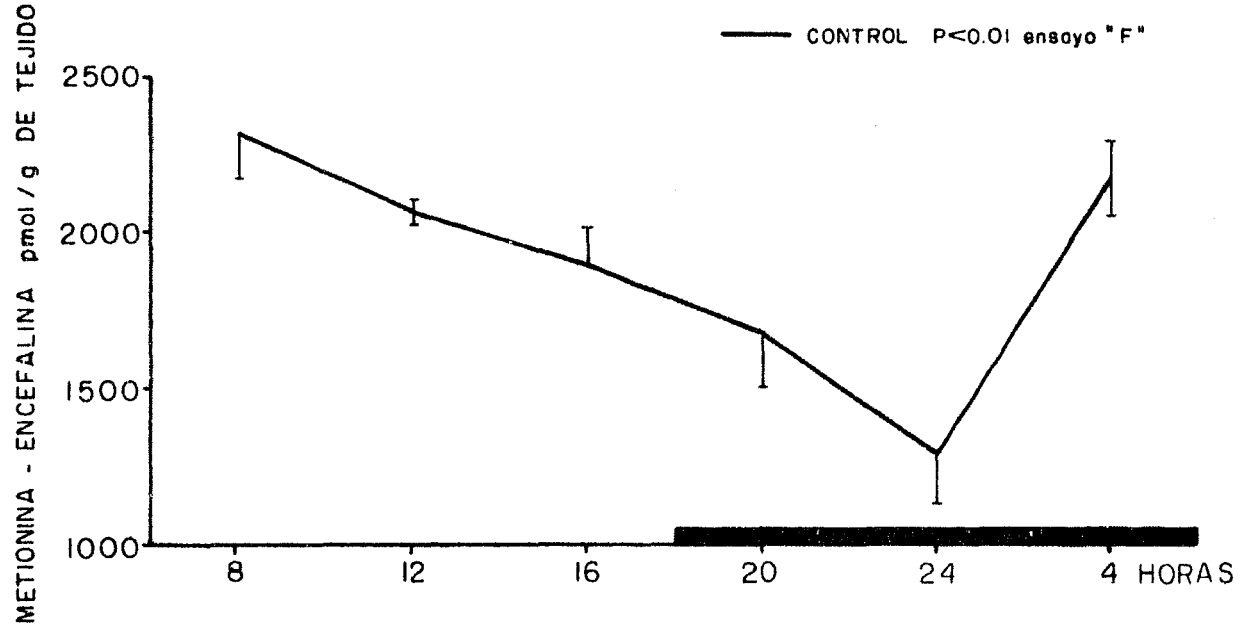
En la Gráfica V se muestran los valores para la leu-encefalina en el cuerpo estriado. El pentapéptido no mostró ningún cambio estadísticamente significativo a lo largo del ciclo analizado.

En la gráfica VI se representan los datos correspondientes a la leu-encefalina en la amígdala. En este caso la mayor concentración se observó a las 8 a.m. Posteriormente hay una disminución progresiva, alcanzándose los valores más bajos a las 20 hrs.; a partir de entonces vuelven a incrementarse hasta alcanzar concentraciones cercanas a las más altas hacia las 4 a.m.

El ensayo estadístico demuestra que el cambio experimentado durante el ciclo por el pentapéptido es estadísticamente significativo.

GRAFICA III

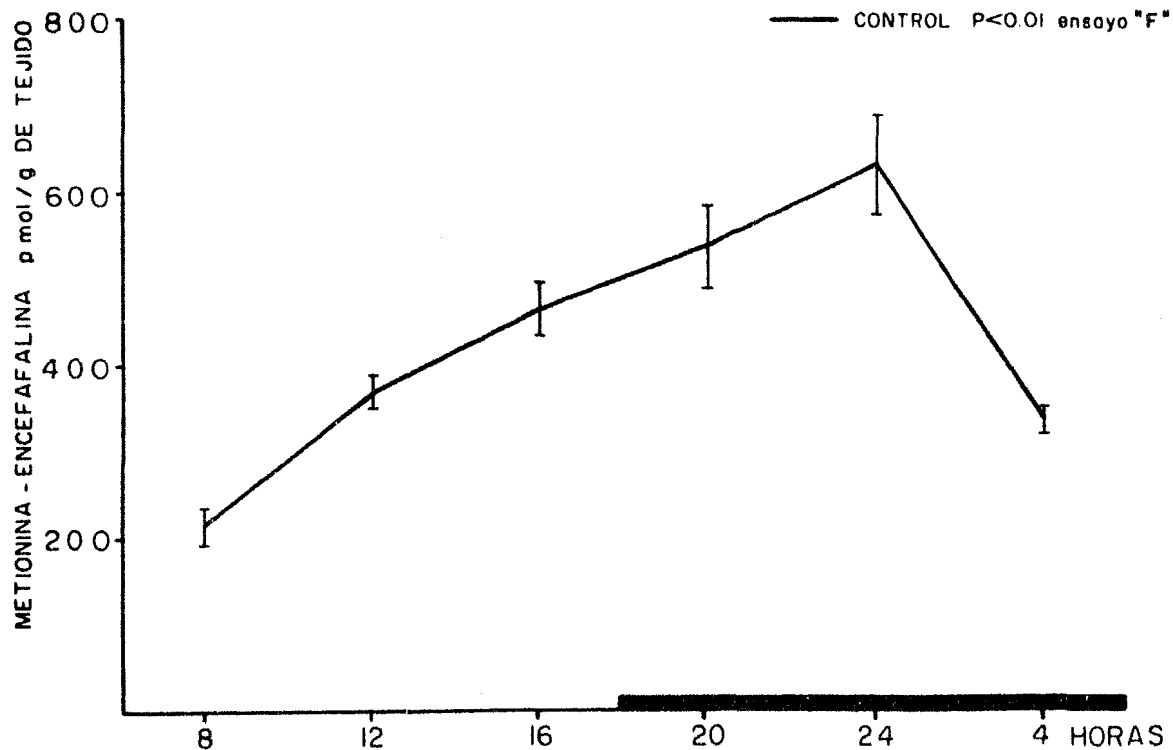
RITMO DIURNO DE LA METIONINA - ENCEFALINA
ESTRIADO



RITMO DIURNO DE LA METIONINA - ENCEFALINA EN EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA. LOS VALORES SE EXPRESAN EN pmol/g DE TEJIDO Y REPRESENTAN LA MEDIA \pm ERROR ESTANDAR. NUMERO DE ANIMALES 6-7

GRAFICA IV

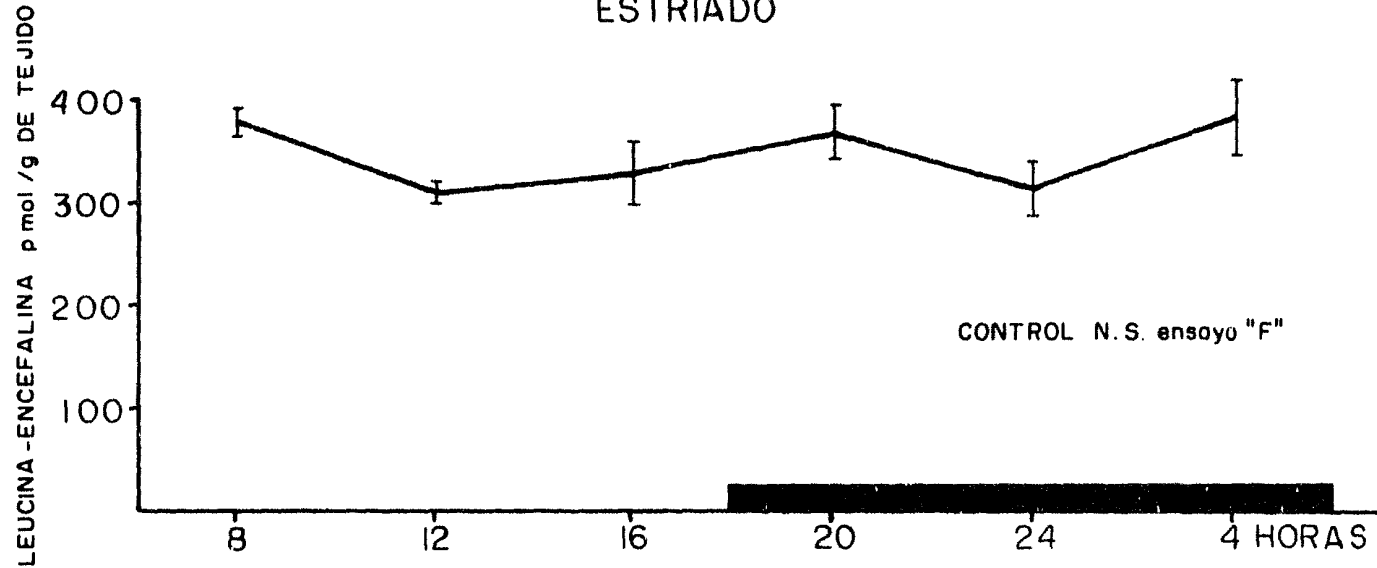
RITMO DIURNO DE LA METIONINA - ENCEFALINA
AMIGDALA



RITMO DIURNO DE LA METIONINA - ENCEFALINA EN LA AMIGDALA DEL LOBULO TEMPORAL DE LA RATA. LOS VALORES SE EXPRESAN EN p mol /g DE TEJIDO Y REPRESENTAN LA MEDIA \pm ERROR ESTANDAR. NUMERO DE ANIMALES 6-7

GRAFICA V

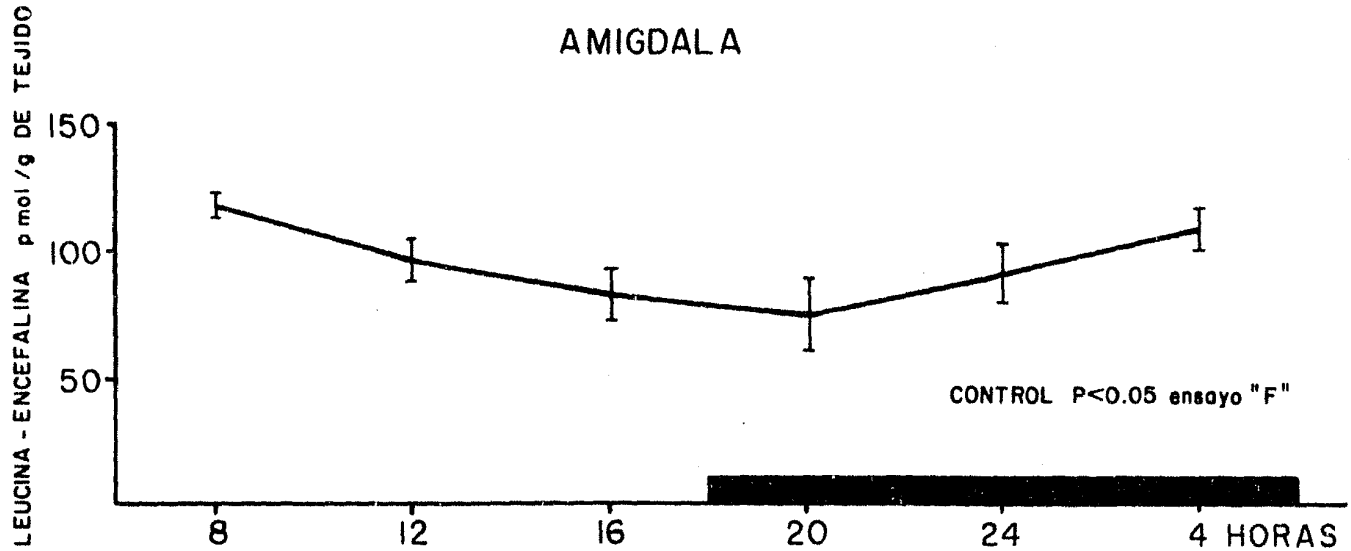
RITMO DIURNO DE LA LEUCINA - ENCEFALINA
ESTRIADO



RITMO DIURNO DE LA LEUCINA - ENCEFALINA EN EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA. LOS VALORES SE EXPRESAN EN p mol / g DE TEJIDO Y REPRESENTAN LA MEDIA \pm ERROR ESTANDAR. NUMERO DE ANIMALES 6-7

GRAFICA VI

RITMO DIURNO DE LA LEUCINA - ENCEFALINA
AMIGDALA



RITMO DIURNO DE LA LEUCINA - ENCEFALINA EN LA AMIGDALA DEL LOBULO TEMPORAL DE LA RATA. LOS VALORES SE EXPRESAN EN pmol / g DE TEJIDO Y REPRESENTAN LA MEDIA \pm ERROR ESTANDAR. NUMERO DE ANIMALES 6-7

IV. DISCUSION DE RESULTADOS

En 1977, Frederickson y col. reportaron que la actividad analgésica de la morfina así como la hiperalgésica de la naloxona presentan variaciones diurnas, con una mayor respuesta durante la fase de oscuridad (68). Posteriormente estos autores observaron que al medir la concentración de met-enkefalina y de leu-enkefalina en cerebro total de ratón, no existía diferencia significativa al comparar los valores de las 7.30 hs. con los de las 15.30 hs. (69).

Sin embargo, cuando midieron la actividad biológica opioide con el ensayo de la vasa de ratón, encontraron un aumento de ésta en la tarde.

En función de estos resultados, concluyeron que este efecto podría deberse a un compuesto opioide diferente de las encefalinas (69).

Estas observaciones se vieron reforzadas por el hallazgo de Kerdelhue y col. (72), quienes encontraron un marcado ritmo circadiano de la B-endorfina en el septum, el bulbo, la médula oblongata y el cerebelo, presentándose un pico de mayor actividad durante la fase oscura.

Por otro lado, Przewlocki y col. reportaron que la dinorfina también presenta un ritmo circadiano en el hipotálamo, con una mayor concentración en la fase de oscuridad (71). Naber, en 1981, reportó un aumento de la actividad de los receptores opiáceos durante la fase oscura (70).

Con base en los resultados expuestos, podríamos afirmar que el único grupo de compuestos opioides que no presentan un ritmo circadiano son las encefalinas.

Sin embargo, analizando la información, vemos que el trabajo de Frederickson puede ser sujeto a varias críticas. La primera es que el estudio se realizó utilizando cerebro total, lo cual puede ocultar diferentes efectos regionales. Por otra parte la concentración de los péptidos se midió solamente en dos periodos de tiempo, no incluyéndose ningún valor durante la fase oscura.

Los resultados del presente estudio demuestran que tanto la leu-encefalina como la met-encefalina presentan un ritmo diurno. Este depende del péptido y también de la estructura que se analice.

La met-encefalina presenta un ritmo diurno, tanto en la amígdala como en el cuerpo estriado del cerebro de rata. En la amígdala se caracteriza por mostrar un pico de máxima concentración durante la fase oscura mientras que en el cuerpo estriado se observa el fenómeno opuesto.

Que estas estructuras presenten un comportamiento diferencial en relación al sistema opioide no es nuevo ya que en otros trabajos bioquímicos y farmacológicos se describen diferencias en la respuesta entre ambas regiones.

Algunos autores reportan que la inyección de morfina en el cuerpo estriado produce una inhibición de la descarga neuronal, mientras que en la amígdala se observa una excitación en la actividad espontánea (78).

Esta diferencia sugeriría que el recambio de la met-enkefalina es diferente para cada una de estas estructuras, lo cual fue propuesto por otros autores cuando compararon la biosíntesis de met-enkefalina en el cuerpo estriado y en el hipotálamo (62).

Por otro lado, en investigaciones de Vindrola y col. se encontró que el Kindling farmacológico inducido por PTZ produce un aumento permanente en la concentración de la met-enkefalina en la amígdala, no modificándose los valores de este péptido en el cuerpo estriado (67).

La leu-enkefalina presentó un ritmo diurno en la amígdala con una disminución durante la etapa de oscuridad. Este pentapéptido no presentó un ritmo durante el ciclo en el cuerpo estriado.

Este tipo de comportamiento para la leu-enkefalina podría atribuirse, como ya se propuso para la met-enkefalina, a una diferente velocidad de recambio del pentapéptido en la

amígdala y en el cuerpo estriado.

En cuanto al diferente comportamiento presentado por la met-enkefalina y la leu-enkefalina Vindrola y col. encontraron los siguientes resultados:

- Durante el desarrollo de Kindling eléctrico amigdalino hay un aumento progresivo de la leu-enkefalina en el cerebro de rata, previo a la aparición de las crisis convulsivas mientras que la met-enkefalina sólo se modifica después de varias crisis epilépticas (79).
- La met-enkefalina presenta un aumento permanente en varias estructuras del sistema nervioso de animales que fueron sometidos al Kindling farmacológico con PTZ; por el contrario la leu-enkefalina no se modifica en animales sometidos al mismo tratamiento (67).

¿Cómo podríamos explicar la diferencia entre las respuestas presentadas por la met-enkefalina y la leu-enkefalina?

Diversos trabajos proponen que tanto la met-enkefalina como la leu-enkefalina provienen de la misma molécula precursora (proenkefalina-A) donde se encuentran en una proporción de cuatro moléculas de met-enkefalina por una molécula de leu-enkefalina. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que una molécula de leu-enkefalina podría provenir de otro precursor: la proenkefalina-B o prodinorfina. Por otra parte Larsson, quien realizó estudios de inmunohistoquímica, describió que la leu-enkefalina y la met-enkefalina se encuen-

tran en neuronas distintas (80). En un tercer estudio realizado por el grupo de Hugues, se reporta que la leu-encefalina se puede encontrar almacenada en el tejido en forma de sulfato, fenómeno que no se observa en el caso de la met-encefalina (81).

Si consideramos las ideas propuestas por Larsson sería relativamente fácil discutir el comportamiento diferencial de ambas encefalinas.

Suponiendo que fueran sintetizadas en dos neuronas diferentes, sería factible encontrar distintos comportamientos. Esto mismo sucede si consideramos que ambos pentapéptidos pueden provenir de diversos precursores. Sin embargo, no podemos hacer afirmaciones basadas en este tipo de análisis ya que los hallazgos en los que se asientan no resultan completamente concluyentes.

La información más sólida hasta el momento es la que propone que ambas encefalinas provienen de un mismo precursor y obviamente de la misma neurona.

Con base en esto puede sugerirse que el cambio diferencial entre ambos pentapéptidos, puede deberse a un procesamiento también diferencial de la molécula precursora, debido a la intervención de diferentes enzimas y/o al almacenamiento de estos compuestos en las vesículas sinápticas, lo cual estaría relacionado con que unas moléculas se encuentran en forma de sulfatos y las otras no. Esto estaría determinando que ante un estímulo fisiológico estos compuestos se sinteticen, almacenen y liberen

en forma diferente.

En base a estos conceptos, el análisis del sistema encefalinérgico a las 8 hs. y a las 24 hs. podría ayudar a esclarecer la bioquímica de las encefalinas.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que ambas encefalinas podrían estar vinculadas a diferentes funciones; lo cual deberá ser verificado con base en investigaciones posteriores.

V. BIBLIOGRAFIA

1. SNYDER SH (1981). Los receptores de los opiáceos y sustancias opiáceas endógenas. En: El cerebro. 2a. Ed. Editorial Labor, S.A. España pp. 154-168.
2. BAYON A (1981). Endorfinas y encefalinas, ¿opio en el cerebro? Ciencia y Desarrollo. México, D.F. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. VII(41):173-180.
3. ROSSIER J and G. CHAPOUTIER (1982). Brain opiates. Endeavour, Newseries. 6(4):168-176.
4. PERT CB; SH SNYDER (1973). Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. Science 179:1011-1014.
5. HUGUES J; TW SMITH; HW KOSTERLITZ; LA FOTHERGILL; BA MORGAN; HR MORRIS (1975). Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate agonist activity. Nature 258:577-579.
6. BRADBURY AF; DG SMYTH; CR SNELL; NJ BIRDSALL and EC HULME (1976). C-Fragment of lipotrophin has a high affinity for brain opiate receptors. Nature 260:793-795.
7. LI CH (1964). Lipotrophin, a new active peptide from pituitary glands. Nature. 201:924.
8. LING N; R BURGUS and R GUILLEMIN (1976). Isolation, primary structure and synthesis of α -endorphin and γ -endorphin, two peptides hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73(11):3942-3946.

9. KANGAWA K; MINAMINO N; N CHINO; S SAKAKIBARA and H MATZUO (1981). The complete amino acid sequence of Alfa-neo-endorphin. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 99:871-878.
10. GOLDSTEIN A; S TACHIBANA; LI LOWNNEY; M. HUNKAPILLER and L HOOD (1979). Dynorphin (1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(12):6666-6670.
11. SCHWARTZ JH (1981). Chemical basis of synaptic transmission. In: *Principles of neural science*. Kandel E.R. and J.H. Schwartz. Elsevier North Holland, Inc. New York, pp. 106-120.
12. KUHAR MJ; CJ PERT and SH SNYDER (1973). Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* 245:447-450.
13. MAINS RE; BA EIPPER and N LING (1977). Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:3014-3018.
14. BLOOM F; EO BETTENBERG; J ROSSIER; N LING; J LEPPALUOTO; TM VARGE and R GUILLEMIN (1977). Endorphin are located in the intermediate and lobes of the pituitary, not in neurohypophysis. *Life Science.* 20:43-48.
15. STERN A; RV LEWIS; S KIMURA; J ROSSIER; S STANLEY and S UDENFRIEND (1980). Opioids hexpeptides and heptapeptides in adrenal medulla and brain possible implications on biosynthesis of enkephalins. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 205:606-613.

16. KAKIDANI H; Y FURUTANI; A TAKAHUSHI; M NODA; Y MARIMOTO; T HIRCOSE; M ASAI; S INAYAMA; S NAKANISHI and S NUMA (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine B-neoendorphin/dynorphin precursor. *Nature*. 298:245-249.
17. JONES BN; JE SHIVELY; DL KILPATRIRCK; AS STERN; VR LEWIS; K KOJIMA and S UDENFRIEND (1982) Adrenal opioids proteins of 8600 and 12660 daltons Intermediates in proenkephalins processing. *Proc. Natl. Acad. Scie.USA* 79:2096-2100.
18. KIMURA S; VR LEWIS; AS STERN; J ROSSIER; S STEIN and S UDENFRIEND (1980). Probable precursors of leu-enkephalin and met enkephalin in adrenal medulla: Peptides of 2-5 Kdal. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*. 77: 1681-1685.
19. LEWIS RV; AS STERN; S KUMURA; J ROSSIER and S UDENFRIEND (1980). Purification and partial chemical characterization of 8000 and 14000 daltons enkephalin precursors. *Proc. Natl. Acad. Scie.* 77:5018-5020.
20. KANGAWA K; M IGARASHI and H MATSUO (1979). Alfa-neo-endorphin: A big leu-enkephalin with potent opiate activity from porcine hypothalami. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86:153-160.
21. NODA M; Y FURUTANI; H TAKAHASHI; M TOYOSATO; T HIROSE; S INAYAMA; S NAKANISHI and S NUMA (1982). Cloning and sequence of cDNA for bovine proenkephalin. *Nature*. 295:202-206.
22. COMB M; PH SEEBURG; J ADELMAN; L ERDEN and E HERBERT (1982). Primary structure of the human met- and leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature (London)* 295:663-666.

23. EVANGELISTA R; P RAY; RV LEWIS (1982). A "trypsin-like" enzyme in adrenal chromaffin granules: a Proenkephalin processing enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106:895-903.
24. JOHNSON RG; NJ CARLSON and A SCARPA (1978). A_{pH} and catecholamines distribution in isolated chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 253:1512-1521.
25. LINDBERG I; H-YT YANG and E COSTA (1982). An enkephalin-generating enzyme in bovine adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106:186-193.
26. IVERSEN LL; SD IVERSEN; TE BLOOM; T VARGO and R GUILLEMIN (1978). Release of enkephalin from rat Globus Pallidus in vitro. *Nature* 271:679-681.
27. OSBORNE H; V HOLT and A HERTZ (1978). Potassium-induced release of enkephalins from rat striatal slices. *Eur. J. Pharmacol.* 48:219-221.
28. BAYON A; J ROSSIER; A MAUSS; FE BLOOM; LL IVERSEN; N LING and R GUILLEMIN (1978). In vitro release of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin from the rat globus pallidus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:3503-3506.
29. GILBERT PE and WE MARTIN (1976). The effects of morphine and nalorphine like drugs on the nondependent morphine dependent and cyclazocine dependent chronic spinal dog. *J. Pharm. Exp. Ther.* 198:66-82.
30. PERT CB; MJ KUJAR and SH SNYDER (1975). Autoradiographic localization of the opiate in the rat brain. *Life Science.* 16:1849-1854.

31. MARTIN WR; GG EADES; WO THOMPSON; SA THOMPSON and HG FLANARY (1974). Morphine physical dependence in dog. *J. Pharm. Exp. Ther.* 189:759-771.
32. MARTIN WE; CG EADES; JA THOMPSON; RE HUPPER and PE GILBERT (1976). The effects of morphine and nalorphine like drugs in the non-dependent and morphine dependent chronic spinal dog. *J. Pharm. Exp. Ther.* 197: 517-532.
33. GORENSTEIN C and SH SNYDER (1976). Two distinct enkephalinases: solubilization, partial purification and separation from angiotensin converting enzyme. *Life Science.* 25:2065-2070.
34. MALFROY B; JP SWERTZ; A GUYON; BP ROQUES; JC SCHWARTZ (1978). High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature.* 276:523-526.
35. HAMBROCK JM; BA MORGAN and M RANCE (1976). Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature.* 262:782-783.
36. HERSCH LB and Mc KELVY F (1981). An aminopeptidase from bovine brain wich catalyzes the hydrolysis of enkephalin. *J. of Neurochemistry.* 36:171-178.
37. HAYASHI M and K OSHIMA (1977). Purification and characterization of arylamidase from monkey brain. *J. Biochem.* 81:631-639.
38. SCHNEBLI PH; AM PHILLIPS and KR BARCLAY (1979). Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain. *Biochimica and Biophysica Acta.* 569:89-98.

39. TRAFICANTE LJ; J ROTROSEN; J SIEKIERKI; H TRACER and S GERSHON (1980). Enkephalin inactivation by N-terminal tyrosine cleavage: Purification and partial characterization of a highly specific enzyme from human brain. *Life Science*. 26:1697-1706.
40. BARCLAY RK and MA PHILLIPS (1980). Inhibition of enkephalin degrading aminopeptidase activity by certain peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96(4):1732-1738.
41. GORENSTEIN C and SH SNYDER (In press). Characterization of enkephalinases: In: Exogenous and endogenous opiate agonists and antagonists. Weil, E. (ED.) Pergamon-Press.
42. MALFROY B; JP SWERTZ; C LLORENS and JC SCHWARTZ (1979). Regional distribution of high-affinity enkephalin-degrading peptidase (enkephalinase) and effects of lesions suggest localization in the vicinity of opiate receptor in brain. *Neuroscience Letters*. 11:329-334.
43. ERDOS EG; AR JOHNSON and NT BOYDEN (1978). Hydrolysis of enkephalin by cultured human endothelial cells and by purified peptidyl dipeptidase. *Biochem. Pharmac.* 27:843-848.
44. SWERTZ JP; R PERDRISOT; G PATEY; S DE LA BAUME and JC SCHWARTZ (1979). "Enkephalinase" is distinct from brain "Angiotensin-converting enzyme". *Eur. J. Pharmacol.* 57:279-281.
45. LLORENS C; G GRACEL; JP SWERTZ; R PERDRISOT; MC FOURNIE-ZALUSKI; JC SCHWARTZ and BP ROQUES (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1710-1717.

46. PATEY G; S DE LA BAUME; JC SCHWARTZ; C GROS; B ROQUES; MC FOURNIE-ZALUSKY and E SOROCA-LUCAS (1981). Selective protection of methionine-enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition. *Science*. 212:1153-1155.
47. ANSTEIN M; S MITTMAN and VOGEL (1981). The effects of barbiturates of the degradation of enkephalin by brain enzymes. *Life Science*. 28:185-191.
48. BENUCK M and N MARKS (1980). Characterization of a distinct membrane bound dipeptidyl carboxipeptidase inactivating enkephalin in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95(2):822-828.
49. SAR M; WE STUMPF; RJ MILLER; KJ CHANG and P. CUATRECASAS (1978). Immunohistochemical localization of enkephalin in the rat brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 182:17-38.
50. BURNSTOCK; GT HOKFELT; MD GERSHON; LL IVERSEN; HW KOSTERLITZ and JC SZURZEWSKI (1979). Non-adrenergic, non-cholinergic autonomic neurotransmission mechanisms. *Neurosc. Res. Prog. Bull* 7:379-519.
51. ALUMETZ J; R HAKANSON; F SUNDLER and KJ CHANG (1978). Leu-enkephalin like material in nerves and enterochromaffin cell in the gut. *Histochemistry* 56:187-196.
52. ROSSIER J and FE BLOOM (1980). Central neuropharmacology of endorphins. In: *Neurochemical Mechanisms of opiates and endorphins*. pp.165-185, Loh HH and Ross D (Eds.) Raven Press N.Y.

53. SCHULTZBERG M; T HOKFELT; L TERENIUS; LG ELFVIN; JM LUMBERG; J BRANDT; RP ELDE and M GOLDSTEIN (1979). Enkephalin immunoreactive nerve fibers and cell bodies in sympathetic ganglia of the guinea-pig rat. *Neuroscience* 4:249-270.
54. MILLER JR and MV PICKEL (1980). The distribution and function of the enkephalins. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 28(8):903-917.
55. LIMMOILLA RI; R DI AGUSTINE; RJ MILLER; KJ CHANG and P. CUATRECASAS (1979). Immunocytochemical and radioimmunological study of distribution of Met- and Leu-enkephalins in the gastrointestinal tract. *Neuroscience*. 3:1187.
56. JESSEL TM and LL IVERSEN (1977). Opiate analgesics inhibit Substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature* 268:549-551.
57. BELLUZZI D; N GRANT; V GARSKY; D SARANTAKIS; D WISE and L STEIN (1976). Analgesia induced in vivo by central administration of enkephalin in rat. *Nature* 260:625-626.
58. BUSCHER H; C HILL; D ROMER; F CARDINAUX; A CLOSSE; D HAUSER and J PLESS (1976). Evidence for analgesic activity of enkephalin in the mouse. *Nature*. 261:423-425.
59. URCA G; J FRENK and C LIEBESKIND (1977). Morphine and enkephalins: analgesic and epileptic properties. *Science*. 179:83-86.

60. FRENK H; BC Mc CARTHY and JC LIEBESKIND (1978). Different brain areas mediate the analgesic and epileptic properties of enkephalin. *Science*. 200:335-336.
61. HAFFMANS J; J BLANKWATER and MR DZOLJIC (1983). Correlation between the distribution of ^3H -labelled enkephalin in rat brain and the anatomical regions involved in enkephalin-induced seizures. *Neuropharmacology*. 22(8): 1021-1028.
62. HONG JS; JC GUILLIN; H -YT YANG and E COSTA (1979). Repeated electroconvulsive shocks and the brain content of endorphins. *Brain Res*. 177:273-278.
63. HONG JS; PL WOOD; H -YT YANG and E COSTA (1980). Recurrent convulsions and hippocampal (Met⁵-) enkephalin content. In: neural peptides and neural communication. E. Costa and M. Trabucchi. Raven Press, New York. pp. 385-397.
64. HONG JS; H -YT YANG; JC GUILLIN; AM DI GIULIO; W FRATTA and E COSTA. Chronic treatment with haloperidol accelerates the biosynthesis of enkephalins in rat striatum. (1979). *Brain Res*. 160:192-195.
65. VINDROLA O; R BRIONES; M ASAI and A FERNANDEZ Guardiola (1981). Amygdaloid Kindling enhances the enkephalin content in rat brain. *Neuroscience Letters*. 21:39-43.
66. VINDROLA O; M ASAI; M ZUBIETA and G LINARES (1983). Brain content of immunoreactive (Leu⁵)-enkephalin after pentylenetetrazol-induced convulsions. *Eur. J. Pharmacol*. 90:85-89.

67. VINDROLA O; M ASAI; M ZUBIETA; E TALAVERA; E RODRIGUEZ and G LINARES (1984). Pentylentetrazol Kindling produces a long lasting elevation of IR-met-enkephalin but not IR-leu-enkephalin. Brain Res. (In press).
68. FREDERICKSON R; V BURGIS and JD EDWARDS (1977). Hyperalgesia induced by Naloxone follows diurnal rhythm in responsivity to painful stimuli. Science. 198:756-758.
69. WESCHE DL and RCA FREDERICKSON (1979). Diurnal differences in opioid peptide levels correlated with nociceptive sensitivity. Life Science. 24:1861-1868.
70. NABER D; A WIRZ-JUSTICE and M KAFKA (1980). Circadian rhythm in rat brain opiate receptor. Neuroscience Letters. 21:45-50.
71. PRZEWLOCKI R; W LASSON; AM KONECKA; C GRAMSCH; A HERZ and LD REID (1983). The opioid peptide dynorphin, circadian rhythms, and starvation. Science. 219:71-73.
72. KERDELHUE B; M KARTSZI; C PASQUALINI; A REINBERG; E MEZEY and M PALKOVITZ (1982). Circadian variations in β -endorphin concentrations in pituitary and in some brain nuclei of the adult male rat. Brain Res. 261:243-248.
73. KELVIN D; GIBSON; M SOLIMAN and CH WALKER (1981). Diurnal variation of leucine and methionine-enkephalin levels in the spinal cord and adrenal gland. Annual meeting of neuroscience. Los Angeles.

74. SHANKS M; V CLEMENT-JONES; CJ LINSELL; PE MULLEN; LH REES and GM BESSER (1981). A study of 24-hour of plasma met-enkephalin in man. *Brain Res.* 212:403-409.
75. GLOWINSKI J and LL IVERSEN (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J. Neurochemistry.* 13:655-669.
76. ENGEL J JR and NS SHARPLESS (1977). Long-lasting depletion of dopamins in rat amygdala induced by Kindling stimulation. *Brain Res.* 136:381.
77. ITO T; M HORI; K YOSHIDA and M SHIMUZU (1977). effect of anticonvulsants seizures developing in the course of daily administration of Pentylenetetrazol to rats *Eur. J. Pharmacol.* 45:165.
78. CHOU DT and SC WANG (1977). Unit activity of amygdala and hippocampal neurons: effects of morphine and benzodiazepines. *Brain Res.* 126:427-440.
79. VINDROLA O; R BRIONES; M ASAI and A FERNANDEZ-GUARDIOLA (1981). Brain content of Leu⁵-and Met⁵-enekphalin changes independently during the development of Kindling in rat. *Neuroscience Letters.* 26:125-130.
80. LARSSON LI; S CHILDERS and SH SNYDER (1979). Met- and Leu-enkephalin immunoreactivity in separate neurons. *Nature.* 282:407-409.
81. UNSWORTH CD and J HUGUES (1982). O-sulfated Met-enkephalin in brain. *Nature.* 295:519-522.