

11261
3
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL

AUTONOMA DE MEXICO

=====

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTOS DE TIPO OPIACEO PRODUCIDOS POR LA
CICLOHEXIMIDA Y LA BACITRACINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN
CIENCIAS BIOMEDICAS (AREA: FARMACOLOGIA)

P R E S E N T A:

JOSE LUIS FIGUEROA-HERNANDEZ

MEXICO D.F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| SUMMARY..... | 3 |
| I. INTRODUCCION | |
| 1. Antecedentes generales..... | 5 |
| 2. Los receptores opiáceos..... | 10 |
| 3. Los péptidos opiáceos..... | 19 |
| 4. Localización anatómica, síntesis, almacenamiento, liberación y metabolismo de los péptidos opiáceos..... | 29 |
| 5. Participación en mecanismos fisiológicos y efectos farmacológicos de los péptidos opiáceos..... | 36 |
| 6. Planteamiento del problema, hipótesis de trabajo y objetivos del estudio..... | 42 |
| II. METODOS Y RESULTADOS | |
| 1. Susceptibilidad de tres cepas de ratón al efecto locomotor de la morfina..... | 45 |
| 2. Efecto de diversos fármacos sobre la actividad locomotora del ratón. Influencia del pretratamiento con naloxona..... | 52 |
| 3. Actividad antinociceptiva en el ratón. Influencia del pretratamiento con naloxona..... | 60 |
| 4. Toxicidad aguda. Influencia del pretratamiento con naloxona..... | 70 |
| 5. Fármacos empleados..... | 72 |
| III. DISCUSION | 73 |
| IV. CONCLUSIONES | 80 |
| V. BIBLIOGRAFIA | 82 |

Debía conocer el opio, saber del opio, para dar mi testimonio... Fumé muchas pipas, hasta que conocí... No hay sueños, no hay imágenes, no hay paroxismo... Hay un debilitamiento melódico, como si una nota infinitamente suave se prolongara en la atmósfera... Un desvanecimiento, una oquedad dentro de uno... Cualquier movimiento del codo, de la nuca, cualquier sonido lejano de carruaje, un bocinazo o un grito callejero, entran a formar parte de un todo, de una reposante delicia...

FABLO NERUDA *

* Neruda, P.: Confieso que he vivido. Memorias. Seix Barral, S.A., México, 9a. edición, 1979.

RESUMEN

EFFECTOS DE TIPO OPIACEO PRODUCIDOS POR LA CICLOHEXIMIDA Y LA BACITRACINA

Diversos estudios sugieren que los péptidos opiáceos, especialmente las encefalinas, actúan como neurotransmisores o como neuromoduladores en el sistema nervioso central, y se ha demostrado, en los sitios apropiados, la presencia de las enzimas necesarias para su síntesis y biodegradación. Se sabe que las encefalinas son inmediatamente hidrolizadas en sus aminoácidos constituyentes por la acción de aminopeptidasas; asimismo, que los inhibidores de estas enzimas aumentan y prolongan los efectos de las encefalinas. El propósito de este trabajo fue conocer si un grupo de antibióticos, capaces de inhibir la síntesis proteica a través de diversos mecanismos, producen en el ratón efectos de tipo opiáceo. En un primer grupo de experimentos, ratones macho, C-57-Black, de 20 a 30 g de peso, fueron inyectados intraperitonealmente con morfina (3, 10, 30 y 100 mg/kg) cicloheximida, bacitracina, cloramfenicol, anisomicina, purosomicina y dehidroemetina (37.5, 75, 150, 300 y 600 mg/kg, ip) y la actividad locomotora espontánea fue determinada, durante un período de 60 min, por medio de cajas de actividad locomotora. En un segundo grupo de experimentos, en los que se utilizaron ratones macho o hembras Taconic, de 20 a 30 g de peso, se determinó el efecto antinociceptivo de los fármacos indicados por medio del procedimiento de la pinza arterial. Los compuestos que mostraron propiedades antinociceptivas en dicha prueba (morfina, cicloheximida, bacitracina) fueron sometidos a los procedimientos de plancha caliente y estiramiento corporal inducido por acetilcolina. Cada fármaco fue probado a cuatro o cinco niveles de dosis y se utilizaron 10 animales por cada dosis. En la última serie de experimentos se determinó la toxicidad aguda intraperitoneal de la morfina, la cicloheximida y la bacitracina en un grupo de ratones Taconic machos de 20 a 30 g de peso. La DL₅₀ y los límites de confianza 95 se calcularon por medio del procedimiento de Litchfield y Wilcoxon. Se encontró que la morfina y la cicloheximida aumentan, en forma dosis-dependiente, la actividad locomotora del ratón y que inhiben las respuestas conductuales a los estímulos nociceptivos. En todos los casos, la potencia relativa de la cicloheximida fue considerablemente inferior a la de la morfina. El patrón de efectos de la bacitracina fue diferente: disminuyó la actividad locomotora y su efecto antinociceptivo fue muy discreto. Ninguno de los otros fármacos probados aumentó la actividad locomotora o mostró efectos antinociceptivos. El pretratamiento con naloxona antagonizó claramente la hiperactividad, la analgesia y la letalidad inducidos por la morfina y la cicloheximida; y sólo discretamente la analgesia y la letalidad provocadas por la

bacitracina. Estos resultados revelan que la administración sistémica de cicloheximida produce efectos biológicos semejantes a los de la morfina. Tales efectos pueden ser debidos a una inhibición de las enzimas biodegradantes de las encefalinas, o bien a una acción directa sobre los receptores opiáceos. Ninguna de estas dos posibles explicaciones sobre su mecanismo de acción pueden precisarse con base en los estudios que aquí se reportan. En el caso de la bacitracina se puede suponer que sus efectos involucran al sistema encefalinérgico, ya que se ha reportado que esta substancia aumenta los niveles cerebrales de encefalinas; sin embargo, sus efectos no son claramente antagonizados por la naloxona y sólo se presentan con dosis neurotóxicas.

SUMMARY

OPIOID-LIKE EFFECTS PRODUCED BY CYCLOHEXIMIDE AND BACITRACINE

Several studies suggest that some opioid peptides, enkephalins in particular, may function as either neurotransmitters or neuromodulators in the central nervous system, and it has been demonstrated the presence of the enzymes necessary for its synthesis and breakdown, at appropriate sites. Enkephalins are almost immediately hydrolyzed into their constituent amino acids by the action of aminopeptidases. It has also been shown that some aminopeptidase inhibitors increase and prolong the biological effects of enkephalins. The purpose of this work was to determine whether some antibiotics, which inhibit the protein synthesis by different mechanisms, induce opioid-like effects in mice. In a first group of experiments, male C57-Black mice, ranging in body weight from 20 to 30 g, were injected intraperitoneally with morphine (3, 10, 30 and 100 mg/kg), cycloheximide, bacitracine, chloramphenicol, anisomycin, puromycin or dehydroemetine (27.5, 75, 150, 300 and 600 mg/kg), and the spontaneous locomotor activity was determined, during 60 min period, by means of photocell locomotor activity cages. In a second group of experiments, male or female Taconic mice, weighing 20 to 30 g, were used. Antinociceptive activity of the above mentioned drugs was determined by the artery clip method. Compounds showing antinociceptive activity in this test (morphine, cycloheximide, bacitracine) were further assessed in the hot plate and writhing induced by acetylcholine procedures. Each drug was tested at four or five dose levels on 10 animals per each dose. In the last group of experiments, acute intraperitoneal toxicity was determined for morphine, cycloheximide and bacitracine in male Taconic mice weighing 20 to 30 g. LD₅₀s and 95% confidence limits were calculated by the method of Litchfield and Wilcoxon. It was found that morphine and cycloheximide induce a dose-dependent increase in the locomotor activity of mice and that effectively inhibits the behavioral responses to nociceptive stimuli. In all these actions cycloheximide was considerably less potent than morphine. Bacitracine possess a different pattern of effects: reduce locomotor activity and its antinociceptive effects were evident only at neurotoxic doses. Neither increase in locomotor activity nor antinociceptive effects were observed with other drugs tested. Pretreatment with naloxone clearly antagonized the locomotor activity, analgesia and lethality of morphine and cycloheximide, and blocked somewhat the analgesia and lethality induced by bacitracine. These data indicate that the systemic administration of cycloheximide induces biological effects similar to those of morphine. It remains to be established whether these effects are due to an inhibition of the synthesis of aminopeptidases or to a direct action on opioid receptors. In the

case of bacitracine, it is possible that the encephalinergetic system is involucrated in its biological effects since it has been reported that this drug increase the brain levels of enkephalins; however, its effects are not clearly antagonized by naloxone and are only induced at neurotoxic doses.

I. INTRODUCCION

I.1. Antecedentes generales

El opio es probablemente uno de los medicamentos más antiguo. El conocimiento inicial del hombre acerca de los efectos psico estimulantes del Sistema Nervioso Central, del producto que se obtiene de las cápsulas verdes de la adormidera (*Papaver somniferum*) está implícito en los registros sumerios de hace más de 6000 años. Sus propiedades medicinales y métodos de recolección están descritos en las tablas medicas asirias (siglo VII a.C.) y en el papiro de Ebers, que data de los años 1500 a.c. Los escritos de Homero permiten identificar que los griegos usaban regularmente el opio desde el año 900 de la misma época. Hipócrates, Dioscórides y Galeno adoptaron y extendieron el uso del opio y los romanos aprendieron acerca de él durante la conquista del Mediterráneo. En el Medioevo, la difusión del conocimiento de opio pasó del mundo árabe a las culturas persica, china e india. En el siglo XVII, el opio era ampliamente utilizado en Europa, donde se le consideró como el remedio más universal y efectivo (Di Palma).

Como resultado del aislamiento de un alcaloide puro, efectuado por Sertöner en 1805 (Di Palma), y de la identificación de otros alcaloides en el opio, además de la morfina, se intensificaron las investigaciones sobre la química y la farmacología de estos productos. Estas pesquisas también fueron estimuladas por el reconocimiento formal de los riesgos de su uso y abuso. Los avances en el campo de la química permitieron que, durante el

Último cuarto de siglo XIX, se profundizara el estudio de la molécula de la morfina y se intensificara la búsqueda de un analgésico potente sin la capacidad de producir dependencia, búsqueda que también generó la metodología útil para el análisis razonado de sus efectos biológicos.

Después de un lapso de casi 100 años, aún cuando se han observado avances significativos, no ha sido posible encontrar un analgésico con las características arriba anotadas. Sin embargo, el conocimiento acumulado en este campo, que constituye uno de los núcleos más sólidos de información farmacológica, fue fundamento para el descubrimiento de las endorfinas, hallazgo cuyos alcances apenas empiezan a vislumbrarse.

Los avances del conocimiento sobre el mecanismo de acción de los fármacos y el análisis experimental del efecto de los opiáceos dieron origen a la idea de que sus acciones biológicas dependen de la unión a sitios específicos, localizados en la superficie o en el interior de las células, y son consecuencia de las etapas químicas y/o físicas que esa unión desencadena. Esta hipótesis estaba sustentada en las siguientes observaciones generales (Snyder, 1977)

1. Todos los opiáceos agonistas muestran semejanzas básicas en su arquitectura molecular, y sus características físico-químicas sugieren interacciones de baja energía con un sitio receptor geométrica y químicamente complementario.

2. Algunas estructuras narcóticas, como la etorfina, son extremadamente potentes y producen sus efectos, en animales,

en dosis del orden de microgramos. La acción de dosis tan pequeñas sugiere siempre que los efectos son mediados a través de receptores por los que la sustancia tiene gran afinidad.

3. Las acciones de los opiáceos tienen un alto grado de estereoselectividad. Usualmente, solo el isómero *levorotario* produce los efectos característicos del grupo. Dicha estereoselectividad apoya la idea de un receptor capaz de distinguir al isómero correcto.

4. Alteraciones menores en la estructura molecular de los agonistas opiáceos resultan en cambios profundos de la potencia farmacológica. De hecho, sustituciones sencillas en ciertas porciones de la molécula se traducen en compuestos con propiedades antagónicas muy específicas. La acción antagónica suele explicarse por un fenómeno de competencia a nivel del sitio receptor (farmacológico).

La identificación y caracterización de los receptores opiáceos requirió de esfuerzos extraordinarios. El obstáculo principal dependía de que estos fármacos se unen a casi cualquier membrana biológica en forma inespecífica, es decir la unión no asociada a un receptor. Después de numerosos intentos se pudo demostrar la existencia de sitios de unión estereoespecífica. Los estudios más significativos fueron realizados simultáneamente por tres grupos independientes (Pert y Snyder, 1973a; Terenius, 1973; Simon y cols, 1973); todos ellos se basaron en el criterio de estereoselectividad formulado por Goldstein y cols en 1971 (50). De 1973 a 1975 se obtuvo información sobre las características, localización y distribución de esos receptores y se confirmó su

existencia en el hombre y en todos los vertebrados principalmente, y en algunos invertebrados. Con estos datos se postuló la posible existencia de un sistema que cumpliera un papel fisiológico y, en consecuencia, la presencia de una sustancia endógena de naturaleza tal que interactuará con dicho receptor; la idea de un ligando endógeno también fue apoyada en el hecho de que es posible producir un estado de analgesia por estimulación eléctrica de algunas partes del cerebro, particularmente de la región gris periacueductal (Reynolds, 1969). La búsqueda de esa sustancia endógena se inició con el análisis de las hormonas y neurotransmisores conocidos; sin embargo, ninguno de ellos cumplió el requisito de alta afinidad por el receptor. Por ello, se consideró que podría tratarse de un elemento cerebral desconocido.

El primer reporte sobre un material endógeno capaz de imitar los efectos farmacológicos de la morfina fue presentado en 1975a por John Hughes (65), quien trabajaba en el laboratorio de Hans Kosterlitz en Aberdeen, Escocia. Pudo demostrar que un extracto acuoso obtenido del cerebro del cerdo inhibe, al igual que la morfina, las contracciones del íleo de cobayo inducidas por estimulación eléctrica, y que este efecto es revertido por la naloxona. Casi simultáneamente otros investigadores reportaron que un material soluble del cerebro de ratas y de bovinos era capaz de impedir la unión de la morfina al receptor opiáceo (Terenius y Wahlstrom, 1974). Ambos hallazgos apoyaron la hipótesis de una sustancia con actividad "tipo morfínica" en el tejido cerebral. A finales de 1975 el grupo de Hughes informó (66) que el efecto biológico del extracto debería atribuirse a dos pentapéptidos que

tenían la secuencia: TIR-GLI-GLI-FEN-MET y TIR-GLI-GLI-FEN-LEU, sustancias a las que denominaron encefalinas: encefalina-metionina y encefalina-leucina. En el mismo artículo se hizo hincapié en el hecho de que la secuencia de la metionina-encefalina estaba presente en el residuo 61-65 de la beta-lipotropina, hormona hipofisiaria de naturaleza peptídica aislada por Li en 1964 (87). Esta observación fundamental originó que en el curso de los últimos años se identificaran otros péptidos, de cadena más larga, con propiedades opiáceas.

El descubrimiento de las encefalinas propició tanto numerosas reconsideraciones conceptuales en varias áreas del conocimiento, como múltiples estudios que han ido ampliando la información sobre la actividad biológica de estas sustancias en el tejido neural. Si bien los datos disponibles no son aún suficientes para determinar su papel fisiológico, existe el consenso de una posible función neurotransmisora o neuromoduladora en algunos sistemas, particularmente en los relacionados con el dolor y las emociones. Asimismo, se les implica en el fenómeno de farmacodependencia y en algunas alteraciones patológicas. Por otro lado, ya se han sintetizado decenas de análogos que tal vez puedan encontrar aplicación terapéutica como analgésicos.

1.2. Los receptores opiáceos

Se acepta que los efectos terapéuticos y tóxicos de muchos fármacos son consecuencia de acciones sobre sitios de unión en el organismo. Por lo general, las sustancias químicas ejercen sus efectos porque interactúan con macromoléculas específicas y así alteran su actividad bioquímica y física. Esta idea, que fue propuesta en los albores del siglo XX (Langley, 1906; Ehrlich, 1913) y determinó el concepto de receptor. Este concepto se ha constituido en uno de los pilares para la investigación científica sobre los efectos y mecanismo de acción de los fármacos.

Aun cuando los receptores para la mayoría de los fármacos no están identificados, nadie duda que la interacción fármaco-célula se efectúa, en muchos casos, en sitios específicos relacionados con la acción de las sustancias químicas. Las relaciones tan sutiles entre la estructura química y la actividad biológica, y la acción competitiva de productos análogos, sólo pueden ser explicadas en dichos términos. Se piensa que los receptores, como los centros activos de una enzima, son grupos químicos (carboxilo, amino, sulfhidrilo, fosfato, etc), espacialmente orientados en patrones que son complementarios con las sustancias químicas con que interaccionan (Goldstein y cols, 1974).

Actualmente se acepta que, en general, el receptor es una macromolécula conformada por sitios reconocibles por sustancias endógenas específicas. La estereoespecificidad de tales sitios está determinada por fracciones de carbohidratos, lípidos y proteínas. La unión de moléculas endógenas o exógenas a este sitio

causa alteraciones o cambios en las moléculas del receptor, en su microambiente o en ambos, lo cual inicia una cadena de eventos que conduce a una respuesta biológica (secreción o liberación de sustancias activas, despolarización, etc).

La unión del fármaco al receptor se lleva a cabo por fuerzas reversibles de tipo iónico, y otras relativamente débiles. Para algunos fármacos están involucradas uniones más firmes de tipo covalente, en cuyo caso su efecto desaparece lentamente (Goldstein y cols, 1974).

Por otro lado, la mayor parte de los receptores hasta ahora caracterizados son proteínas; esto quizá se debe a que la estructura polipeptídica provee la diversidad y especificidad necesarias de forma y de carga. Los sitios de acción que regulan las señales químicas endógenas de neurotransmisores, autacoides, hormonas, son los receptores farmacológicos mejor caracterizados. Otro tipo de proteínas que funcionan como receptores farmacológicos son las enzimas (las cuales pueden ser inhibidas, o bien activadas, por su unión a sustancias exógenas), las proteínas de transporte y las proteínas estructurales.

Tradicionalmente se han utilizado dos procedimientos para perfeccionar el conocimiento sobre receptores: a) el método directo que se orienta a la identificación y caracterización de los sitios de unión, que constituye el método más preciso; y b) el método indirecto, que predomina en la investigación farmacológica, y que hace inferencias sobre las características de un receptor a partir de los efectos que inducen los fármacos. En este caso, la estrategia más común ha sido el estudio de la

relación estructura actividad, (Goldstein y cols, 1974). Ambos métodos han sido utilizados para la identificación y caracterización de los receptores opiáceos.

Desde 1965 se consideró formalmente la posibilidad de que los opiáceos producían sus efectos porque se unían a sitios específicos en el organismo (11). Con fundamento en los estudios de relación estructura actividad, Beckett y Casey propusieron que el receptor opiáceo debía tener estructuras complementarias a la de agonistas y antagonistas opiáceos; es decir, una superficie plana para interactuar con las uniones hidrofóbicas del grupo aromático del opiáceo, un sitio aniónico, que se une al catiónico del narcótico mediante uniones débiles, y una cavidad donde se acople el resto de la molécula morfínica (11).

Posteriormente, Smythies propuso que el receptor opiáceo está constituido por dos cadenas paralelas beta-peptídicas ligadas a través de uniones complementarias entre sus aminoácidos, las cuales se unen a dos cadenas secundarias, constituyendo una estructura plegadiza (148). Esta molécula puede tener dos conformaciones espaciales, las que corresponden una a la unión del agonista y otra para el antagonista. En 1975, Loh reportó que un cerebrosido sulfatado (95) cumple los señalamientos formulados por Beckett y Casey (11) y se ha propuesto, que dicha molécula sea el receptor morfínico o parte de él.

Como se puede apreciar ambos modelos son muy diferentes y a la fecha no está totalmente definida su estructura química.

Como ya se mencionó previamente, dichos sitios fueron identificados categóricamente en 1973 (Pert y Snyder; Terenius, Simon y cols). Ahora se sabe que los sitios de unión estereoespecíficos para los opiáceos se localizan en el SNC y en Sistema Nervioso Periférico, especialmente en el plexo mientérico del intestino (Pert y Snyder, 1973a). Están fuertemente asociados con la fracción membranal de los homogenados tisulares y parecen estar más concentrados en la fracción celular sinaptosomal (Pert y cols, 1974), lo que sugiere una localización en la vecindad de las sinapsis. Tal sitio de unión es saturable y los agonistas y antagonistas se unen a él con un alto grado de afinidad. Las constantes de disociación varían de 0.025 nM para algunos derivados del fentanil hasta una afinidad baja no detectable para los fármacos que poseen actividad opioide mínima o nula. Dicho sitio discrimina fácilmente los estereoisómeros, levorfanol y dextrorfanol, que difieren varios tantos en la magnitud de su afinidad (Pert y Snyder, 1973b; Simon y cols, 1973).

El pH óptimo para que se efectúe la unión varía de 6.5 a 8, y la presencia de sales disminuye la unión. También se encontró que el sodio, en concentraciones normales, disminuye la unión de los agonistas y aumenta la unión de antagonistas. Se supone que el sodio actúa sobre algún sitio de la molécula receptora, diferente al sitio receptor del opiáceo, alterando su conformación espacial de tal manera que favorece la unión del antagonista. Este efecto puede ser reproducido por el ión litio pero no por otros iones de carga positiva. Por otro lado, la presencia de enzimas proteolíticas inhibe claramente la unión estereoespecífica, hecho que sugiere la naturaleza proteica del sitio de unión (Simon y cols, 1973; Pasternak y Snyder, 1973a).

La evidencia más convincente para la presencia de receptores opiáceos se deriva de la correlación entre la afinidad por los sitios de unión y la actividad biológica. De estos estudios destacan los de Creese y Snyder (1975), que estudiaron numerosos agonistas y antagonistas en el ileo de cobayo y los de Stahl y cols (1977), quienes relacionaron la afinidad con la potencia analgésica de 26 estructuras opiáceas.

Actualmente se acepta que la estereoespecificidad, la saturabilidad y la elevada afinidad, además de la estrecha correlación entre la afinidad y la potencia farmacológica de un gran número de agonistas y antagonistas, dan validez a la hipótesis de que dichos sitios de unión constituyen los receptores farmacológicos relevantes de las sustancias opiáceas.

Con el uso de las técnicas de unión al receptor y las de autorradiografía se ha encontrado que la distribución de los receptores opiáceos en el SNC es paralela a la vía del dolor paleoespinal (Kuhar y cols, 1973). También se encuentra una gran densidad de sitios de unión en la amígdala, cuerpo estriado e hipotálamo, todas ellas partes del sistema límbico y tradicionalmente asociadas con la conducta emocional. En la médula espinal los sitios de unión se ubican en la sustancia gelatinosa, relacionada con la conducción de la información sensorial relativa al dolor. A nivel del tallo cerebral, la mayor concentración se encuentra en el núcleo solitario, que parece estar relacionado con el reflejo tusígeno, y en el área postrema, que contiene sitios donde aparentemente actúan los opiáceos para producir náusea y vómito.

Por otro lado, previamente se había considerado la existencia de varios tipos de receptores (Martin, 1976) y fue en 1977 cuando esta hipótesis cobró importancia, cuando Lord y cols encontraron claras diferencias entre las acciones de la morfina y las encefalinas sobre el ileo de cobayo y sobre los conductos deferentes del ratón (97). Estos investigadores observaron que la morfina es más efectiva que la leu-encefalina para inhibir las contracciones del ileo de cobayo provocadas eléctricamente y que la potencia es inversa en los conductos deferentes. Por tal motivo, concluyeron que dichos fármacos actúan en el ileo a través de los receptores μ y a través de otro tipo diferente de receptores localizados en los conductos deferentes, a los que denominaron *delta*. Este hallazgo fue rápidamente confirmado por otros investigadores que emplearon las técnicas de unión al receptor (Chang y Cuatrecasas, 1979). A partir de estos informes se ha postulado la existencia de receptores específicos para la morfina (μ), las encefalinas (*delta*) y la beta-endorfina (*epsilon*), la dinorfina (*kappa*) y la N-alilnormetazocina (*sigma*); además, de dos subtipos (μ_1 y μ_2) de receptores μ (Pasternak, 1986). Estos receptores parecen mediar distintas acciones biológicas y se han clasificado de acuerdo a su especificidad farmacológica (Pasternak y Woods, 1986; Pasternak, 1987). Los ligandos exógenos y endógenos se unen a tales sitios en diversos grados y el predominio y la naturaleza de la combinación entre un ligando particular y un receptor específico determina el perfil biológico característico. Cabe subrayar que los sitios de fijación o reconocimiento específico se han identificado por técnicas de fijación de radioligandos (Pert y Snyder, 1973b; Simon y cols, 1973; Terenius, 1973; Creese y Snyder, 1975;

Zhang y Pasternak, 1980), autorradiográficas (Quirion y cols, 1983) e inmunohistoquímicas (Elde y cols, 1976; Watson y cols, 1982).

Se ha considerado que los receptores opiáceos están involucrados en el control de numerosos sistemas fisiológicos; sin embargo, el análisis de sus propiedades y funciones es en extremo difícil, ya que la multiplicidad de los mismos tiene la complicación adicional de que varios de ellos pueden coexistir en el mismo tejido (Leslie y cols, 1980; Lord y cols, 1977) y aún en una misma célula (Egan y North, 1981; Werz y Mac Donald, 1983). Además, de los numerosos péptidos identificados ninguno de ellos actúa solamente a través de un receptor; de hecho, sus efectos resultantes dependen de su interacción simultánea, en mayor o menor grado, con diversos tipos de receptores opiáceos. Los siguientes párrafos pretenden resumir las funciones más directamente relacionadas con los 5 tipos de receptores opiáceos descritos hasta la fecha.

1. Receptores μ . La analgesia a nivel supraespinal, así como los efectos euforizantes y la depresión respiratoria, que son típicamente considerados como efectos agonistas, parecen depender de los receptores μ (Pasternak y cols, 1980; Bodnar y cols, 1987; Ward y Takemori, 1983). Estos receptores que se encuentran en mayor concentración en la amígdala, hipotálamo, tálamo, núcleo caudado y área gris periacueductal (Goodman y cols, 1980), son especialmente susceptibles a la mayoría de los opiáceos conocidos y a los péptidos opioides. Además, esta población de receptores parece estar constituida por diversas variantes.

En 1986, Pasternak y Woods propusieron la existencia de dos tipos: el sitio μ_1 , que es común y de alta afinidad para la morfina y para las encefalinas; y el μ_2 , que es selectivo para la morfina (113). Los receptores μ_1 , que se encuentran en concentraciones más elevadas en el área gris periacueductual, tálamo medio, cuerpo estriado, colículo superior y rafe mediano (Moskowitz y Goodman, 1985), parecen estar más relacionados con la analgesia supraespinal, la liberación de prolactina, la ingesta de alimento, el recambio de acetilcolina en el cerebro y la catalepsia (Pasternak y cols, 1980; Ling y Pasternak, 1983). Los sitios μ_2 , que también se encuentran en altas concentraciones en el plexo nervioso intestinal, parecen mediar la depresión respiratoria, el recambio de dopamina cerebral, el tránsito gastrointestinal y los efectos cardiovasculares (Gintzler y Pasternak, 1983; Wood y Pasternak, 1983; Ling y cols, 1985).

2. Receptores *delta*. Esta variedad de receptores, que tiene predilección por las encefalinas, parece participar en la analgesia espinal, en el recambio cerebral de dopamina y en la liberación de la hormona de crecimiento. Se les localiza en mayor concentración en las láminas II y IV de la corteza, en la amígdala, núcleo *accumbens*, tubérculo olfatorio y núcleo del puente (Goodman y cols, 1980).

3. Receptores *kappa*. Basado en la caracterización farmacológica de la ketociclazocina en el perro espinal crónico, Martin propuso la existencia de receptores específicos a esta sustancia y los denominó *kappa* (Martin, 1976). Los estudios posteriores confirmaron la presencia de este sitio de unión (Hutchinson y cols, 1975; Oka y cols, 1981; Sherman y Herz, 1981) y se encontró

que la dinorfina, un péptido opioide (Goldstein y cols, 1979), es su ligando natural (Chavkin y cols, 1982). Estos receptores parecen más directamente relacionados con la analgesia espinal, la inhibición de la liberación de hormona antidiurética y la sedación (Pasternak, 1980). Su concentración en diversas áreas varía significativamente de una especie a otra, siendo considerablemente más altas en el cerebro de cobayo y más bajas en la rata.

4. Receptores *sigma*. Estos receptores, en general poco estudiados, son activados por la N-alilnormetazocina (Martin, 1976) y se postula que tienen relación con los efectos disfóricos y alucigenógenos de los opiáceos (Gilbert y Martin, 1976; Holtzman, 1982; Shanon, 1983). La presencia de este tipo de receptores es aun motivo de controversia (Zukin y Zukin, 1981).

5. Receptores *epsilon*. También se ha considerado la posible existencia de receptores específicos para la beta-endorfina (Schultz y cols, 1979 y 1981) y ciertos estudios parecen confirmar esta posibilidad (Johnson y cols, 1982).

1.3. Los péptidos opiáceos

Ya se había mencionado que el artículo de Hughes y cols (1975a) enfatizaba que la secuencia met-enkefalina estaba presente en la estructura de la beta-lipotropina (residuos 61-65), hormona peptídica de 91 aminoácidos que había sido aislada de la glándula pituitaria por Li en 1964 (86). Esta observación llamó poderosamente la atención de los investigadores interesados en los péptidos que se forman en la hipófisis y en el hipotálamo, y pronto se postuló a la beta-lipotropina como posible precursora de la met-enkefalina y de la beta-melanotropina, hormona cuya presencia ya se había identificado en la estructura de la beta-lipotropina.

En 1976 Bradbury y cols reportaron el aislamiento de dos péptidos de cadena larga (18). Su secuencia indicaba que ellos podrían ser derivados de la beta-lipotropina. Uno de ellos, que se aisló de la hipófisis del cerdo, estaba constituido por 31 aminoácidos y se le asignó provisionalmente el nombre de fragmento C de la beta-lipotropina (Bradbury y cols, 1976). Este fragmento, que posteriormente recibió el nombre de beta-endorfina (Fig. 1), también se encontró en la hipófisis de otros mamíferos (Li y Chung, 1976), y del hombre (Chretien y cols, 1976; Li y cols, 1976).

El otro péptido encontrado en la pituitaria del cerdo, que estaba constituido por 27 residuos, se le designó como fragmento C' de beta-lipotropina: el cual carece de los 4 residuos terminales del fragmento C, pero está presente en la misma cantidad.

Por su aislamiento en la pituitaria, se postuló que la actividad biológica de los fragmentos C y C' se lleva a cabo en la periferia y no en el SNC. Sin embargo, con la identificación de las encefalinas fue claro que el peptapeptido con metionina corresponde a la secuencia de aminoácidos presente en la terminación NH_2 del fragmento C de la lipotropina; esto sugirió que el propio fragmento podría tener propiedades analgésicas; esta posibilidad se confirmó experimentalmente y se encontró que el fragmento C es un analgésico muy potente (Loh y cols, 1976) y que estaba presente en el cerebro.

Además de las encefalinas y de los fragmentos C y C' de la lipotropina, se aislaron otros péptidos con secuencias que corresponden a la porción C-terminal de la beta-lipotropina, los cuales tienen grados diversos de actividad opiácea. Con la excepción de la leu-encefalina, se pensó que esta serie de péptidos (endorfinas y encefalinas) tenían un origen común y por ello se les identificó como la "familia" de los péptidos opiáceos. Sin embargo, estudios posteriores señalaron que las encefalinas no se originan de la lipotropina. Se ha demostrado que la secuencia de cinco aminoácidos de la leu-encefalina está presente en el N terminal de dos péptidos opioides descubiertos posteriormente: la alfa-neo-endorfina y la dinorfina (Goldstein y cols, 1981). Actualmente se sabe que la leu-encefalina y la met-encefalina se forman de precursores distintos.

Ahora se acepta que la beta-endorfina, la más abundante de las endorfinas, se sintetiza como parte de una molécula precursora más larga: pro-opiomelanocortina (POMC), que también contiene la

secuencia completa de las hormonas adrenocorticotrófica (ACTH), estimulante alfa-melanocítica (alfa-MSH), estimulante beta-melanocítica (beta-MSH) y betalipotropina (beta-LPH) (Mains y cols, 1977; Rubenstein y cols, 1978; Crine y cols, 1979). Esta molécula precursora también tiene el potencial de generar otras endorfinas, los fragmentos **alfa** (secuencia 61-76) y **gamma** (secuencia 61-77) (Fig. 1). Las características de la POMC permiten considerarla como "prohormona" capaz de generar dichos péptidos en algunos sitios anatómicos. Así, se acepta que la beta-lipotropina es la "prohormona" de la beta-endorfina. Aun cuando la beta-lipotropina parece tener su propio espectro de actividad biológica, no se ha establecido su papel fisiológico. Por otro lado, el camino biosintético delineado arriba representa la única vía por la cual la hipófisis produce ACTH. Por ello, la síntesis de ACTH y de beta-endorfina parecen estar indisolublemente unidas en la hipófisis. Cada vez que esta glándula secreta ACTH, también secreta beta-endorfina.

El procesamiento diferencial de la POMC parece ocurrir en los diferentes tejidos. Tal procesamiento puede incluir la inactivación metabólica de los péptidos generados por el precursor. Por ejemplo, aun cuando en la hipófisis no se metaboliza la ACTH, en el hipotálamo se convierte en alfa-MSH; de la misma manera, la beta-MSH se genera en el lóbulo intermedio de las especies inferiores. El hombre carece de este lóbulo, por lo que se ha postulado que dicha hormona se produce en algunas células dispersas de la propia pituitaria. Las células de la pituitaria segregan beta-endorfina, beta-lipotropina y ACTH. En otras células, los productos que finalmente se secretan están

PRO-OPIDMELANOCORTINA (POMC)

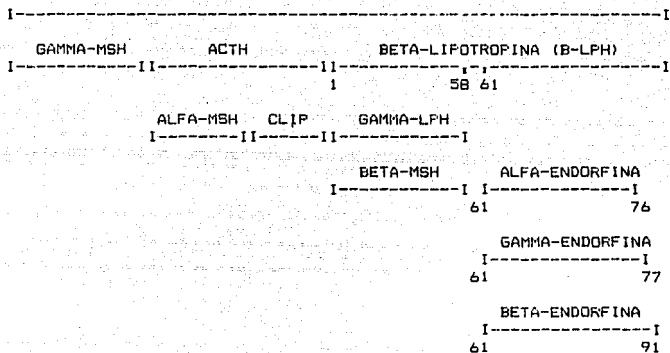


Figura 1. Representación esquemática de la secuencia de la formación de algunos péptidos a partir de la pro-opiomelanocortina.

Hormonas: ACTH (adrenocorticotrófica); MSH (melanocítica; gamma, alfa); CLIP (péptido parecido a corticotropina del lóbulo intermedio).

Reservados todos los derechos. No se permite la explotación económica ni la transformación de esta obra. Queda permitida la impresión en su totalidad.

determinados por el patrón de desdoblamiento de la molécula precursora y por la maquinaria enzimática de la célula. Finalmente, cabe subrayar que los péptidos opiáceos que se generan por el fraccionamiento de la POMC interactúan con los receptores μ , σ , κ y ϵ .

Ya se había señalado que actualmente se acepta que la met-enkefalina y la leu-enkefalina provienen de precursores diferentes a las endorfinas; tales precursores fueron denominados proencefalina A y proencefalina B, que también generan otros péptidos de cadena larga.

Inicialmente se reportó que en las glándulas suprarrenales de los bovinos las enkefalinas se sintetizan a partir de la proencefalina A (parte de una proteína con peso molecular de 50 000). En la Fig. 2 se aprecia que en la estructura de la pro-enkefalina A existen 4 réplicas de met-enkefalina y una de leu-enkefalina, las cuales tienen, a ambos lados, pares de aminoácidos básicos que se supone son los sitios principales de fraccionamiento de la molécula (Lewis y Stern, 1983); la misma secuencia se ha observado en el hombre (Comb y cols, 1982) y en la rata (Yoshikawa y col, 1984). El fraccionamiento de esta molécula genera una gran variedad de péptidos de cadena larga que contienen enkefalina (Holt, 1986). Algunos de estos fragmentos tienen actividad opioide (péptido-F, amidorfina, péptido-E). Por otro lado, se tiene cierta evidencia de que la proencefalina A cerebral es idéntica a la que se encuentra en la médula suprarrenal (Liston y cols, 1983). En el cerebro los péptidos de alto peso molecular que contienen enkefalina se localizan en forma predominante en

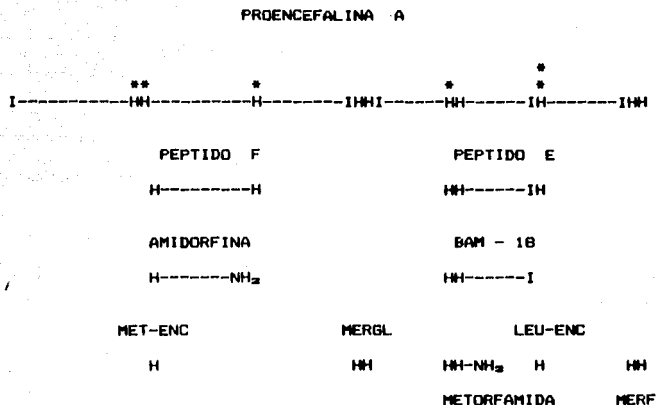


Figura. 2. Representación esquemática de la secuencia de la formación de algunos péptidos a partir de la proencefalina A. En la línea superior,

* = METIONINA-ENCEFALINA; * = LEU-ENCEFALINA

I: Principio y fin de una fracción

BAM-18: Péptido 18

MERGL: Met₂-Arg₄-Gly₇-Leu₈-encefalina

MERF: Met₂-Arg₄-Fen₇-encefalina

el núcleo supraóptico, mientras que la neurohipófisis contiene básicamente encefalinas libres, lo que indica que, probablemente, la proencefalina A es biodegradada totalmente a lo largo del eje hipotalámico-neurohipófisis (Liston y cols, 1984).

El otro precursor, la proencefalina B (prodinorfina), contiene tres secuencias de leu-encefalina (Fig. 3) que están flanqueadas por pares de aminoácidos básicos (Lis-Arg). Se considera que si estos pares son indicativos de puntos de rompimiento, la molécula podría dar lugar a tres péptidos de cadena larga: la beta-neoendorfina (Minamino y cols 1981), la dinorfina A (Goldstein y cols, 1981) y la leumorfina (Nakao y cols, 1983). Sin embargo, se han encontrado numerosos péptidos derivados de la proencefalina B, lo que señala un proceso metabólico mucho más complejo (Hollt, 1986). Los péptidos derivados de la proencefalina B son abundantes en el lóbulo neural de la hipófisis, en el cuerpo estriado y en el cerebro medio (Cone y cols, 1983).

Finalmente, conviene señalar que a partir de la identificación de ligandos endógenos para el receptor opiáceo, se presentó el problema de nomenclatura que debería asignarse a este grupo de sustancias. Por lo antes expuesto, y por razones históricas, conviene precisar los siguientes términos:

a. Encefalinas. Término aplicado a los dos pentapéptidos inicialmente descubiertos y cuyo significado es "en el cerebro". Actualmente, sólo suele aplicarse a los dos productos caracterizados, por Hughes y cols en 1975 (met-encefalina y leu-encefalina).

b. Endorfinas. Término propuesto por Simon en 1975 (International Narcotics Research Conference), que implica la contracción de endo (en el interior) y morfina, para designar a todos los opioides endógenos. En algunos artículos este término se aplica solo a los péptidos de cadena larga (*alfa*, *beta*, y *gamma*-endorfinas).

Algunos autores han propuesto que a todas las sustancias endógenas con efectos opiáceos se les describa como endorfinas. También se han considerado otras denominaciones genéricas: péptidos opioides, opiáceos endógenos, opioides endógenos, endopíoides, etc. En este trabajo estos términos serán utilizados como sinónimos y harán referencia a todas las sustancias endógenas con efectos biológicos semejantes a los conocidos para los opiáceos, capaces de activar los receptores opiáceos. La Fig. 4 describe la constitución química de algunos de los péptidos opioides relevantes.

* TIR-GLI-GLI-FEN-LEU

Leucina-encefalina

* TIR-GLI-GLI-FEN-MET

Hetionina-encefalina

* TIR-GLI-GLI-FEN-MET-TREQ-SER-GLU-LIS-SER-GLU-TREQ-PRO-LEU-VAL-TREQ

Alfa-endorfina

* TIR-GLI-GLI-FEN-MET-TREQ-SER-GLU-LIS-SER-GLU-TREQ-PRO-LEU-VAL-TREQ-LEU

Gamma-endorfina

* TIR-GLI-GLI-FEN-MET-TREQ-SER-GLU-LIS-SER-GLU-TREQ-PRO-LEU-VAL-TREQ-LEU-FEN-LIS-ASN-ALA-ILE-VAL-LIS-ASN-ALA-HIST-LIS-LIS-GLI-GLU

Beta-endorfina

* TIR-GLI-GLI-FEN-LEU-ARG-ARG-ILE-ARG-PRO-LIS-LEU-LIS-TRIP-ASP-ASN-GLU

Dinorfina

* TIR-GLI-GLI-FEN-LEU-ARG-LIS-TIR-PROL-LIS

Alfa-neoendorfina

Figura 4. Secuencia de aminoácidos en algunos de los péptidos opioides relevantes.

1.4. Localización anatómica, síntesis, almacenamiento, liberación y metabolismo de los péptidos opiáceos.

Ya se había mencionado que las endorfinas y las encefalinas provienen de precursores distintos y que difieren también en cuanto a su localización en el organismo.

Las endorfinas están presentes en la hipófisis y en el cerebro. Los tejidos más ricos en beta-endorfina son los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis (Kachaturian y cols, 1985a), de donde se libera, simultáneamente con la hormona adrenocorticotrófica, en respuesta a varias formas de estrés. Dentro del cerebro, las neuronas con mayor concentración de este péptido se localizan en el núcleo *arcuato* hipotálamico, al que por varios años se consideró como la fuente única de endorfinas cerebrales (Fellietier y cols, 1980). A partir del núcleo *arcuato*, las neuronas endorfinérgicas tienen largas proyecciones que se extienden hacia el área anterior preóptica del hipotálamo y a lo largo de la parte dorsal de la línea media del tálamo hacia el tallo cerebral. Estas fibras se extienden hacia el *locus coeruleus* y el núcleo parabraquial y alcanzan el núcleo del tracto solitario (Bloom, 1983). Más recientemente, se han identificado cuerpos neuronales que contienen beta-endorfina en el núcleo caudado del tracto solitario y en el núcleo comisural (Schwartzberg y cols, 1983; Kachaturian y cols; 1985b); sin embargo, la relevancia de este grupo celular es desconocida.

Las neuronas que contienen encefalinas tienen una distribución más amplia en el SNC y en el periférico. A nivel central las concentraciones más elevadas se localizan, en ese orden, en el

globo pálido, núcleo central gris, núcleo *accumbens*, hipotálamo medio, amígdala, puente, médula espinal y *caudado-putamen* (Kobayashi y cols, 1978). De lo anterior, cabe destacar, de manera comparativa, su mayor concentración en el globo pálido (5 a 10 veces) en relación a otras áreas; asimismo, que en todas las zonas estudiadas predomina claramente la met-enkefalina sobre la leu-enkefalina (3 a 8 veces). Otras áreas del CNS que contienen encefalinas son: tálamo, área septal, hipotálamo lateral, cerebro medio, corteza cerebral, hipocampo y área preóptica (Kobayashi y cols, 1978). A nivel periférico, las encefalinas se localizan en las células cromafines de la médula suprarrenal y en el plexo mientérico del intestino delgado.

Numerosos estudios se han orientado al análisis de los mecanismos de síntesis, almacenamiento, liberación y degradación de los péptidos opioides, especialmente sobre las encefalinas, a las que se les ha considerado como neurotransmisores.

La síntesis de péptidos neuronales puede, teóricamente, llevarse a cabo por dos mecanismos: a) mediante la participación de sintetetas; y b) los convencionales en la síntesis de proteínas ribosomales, para la formación de una prohormona, la cual por medio de proteólisis es degradada a péptidos específicos antes de su liberación (Gainer y cols, 1985). Esta hipótesis descansa, fundamentalmente, en el conocimiento de los mecanismos biosintéticos que ocurren para otros péptidos endógenos (insulina, ACTH, vasopresina, oxitocina). Sin embargo, los mecanismos enzimáticos para la conversión de precursores protéicos a péptidos son, en general, poco conocidos. Se considera que la

conversión puede efectuarse con la participación de endopeptidasas (parecidas a la tripsina) y exopeptidasas (parecidas a la carboxipeptidasa-B). Dicha conversión parece ocurrir en los gránulos de la terminación nerviosa durante el transporte axonal. Este proceso de conversión parece ser extremadamente lento. En la médula espinal, utilizando aminoácidos radioactivos, el proceso de conversión de precursores a encefalinas toma aproximadamente 6 hs (Rossier y cols, 1980). En 1980, Bayon y cols, utilizando colchicina y citochalasin, que afectan, respectivamente, la micropolarización de microtúbulos y microfilamentos, encontraron que la disgregación de los primeros, pero no de los segundos, produce en la neuronas encefalinérgicas acumulación de encefalinas en los cuerpos celulares y disminución de su contenido en las terminaciones nerviosas como consecuencia de la interrupción de su transporte axonal. Con estos datos concluyen que las encefalinas pudieran ser transportadas a las terminales nerviosas por un mecanismo semejante al que moviliza neuro-hormonas y vesículas sinápticas (9).

La manera en que se liberan los péptidos opioceos de las fibras nerviosas es poco conocida. Los estudios iniciales indicaron que *in vitro* la liberación de encefalinas es calcio dependiente y puede estimularse por concentraciones altas de potasio y por el depolarizante veratridina (Iversen y cols, 1978; Bayón y cols, 1978; Henderson y cols, 1978), al igual que ocurre para otros neurotransmisores. También se observó que la liberación es proporcional a la cantidad presente en los almacenes tisulares (Bayón y cols, 1978). Ramabadrán y Jacob, basados en la

hiperalgesia inducida por naloxona, postulan la existencia de una liberación sostenida, basal, responsable de un estado de analgesia constante (127); asimismo, sugieren que la estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductual, que produce analgesia en los animales (Akil y cols, 1976 y 1978) y en el hombre (Adams, 1976), implica la liberación de péptidos opiáceos; fenómeno que también ocurre como consecuencia de la acupuntura (Pomeranz y cols, 1976; Sjolund y Erickson, 1976) y la electroacupuntura (Terenius, 1976 y 1978). En todos estos casos, la analgesia es, al menos parcialmente, bloqueada por la naloxona. Con el empleo de la técnica de perfusión-remoción en diversas áreas del SNC se ha encontrado que *in vivo* la liberación de encefalinas es considerablemente menor que *in vitro*, lo que indica un recambio muy lento; asimismo, que el ácido gamma-aminobutírico inhibe la liberación de encefalinas en el globo pálido (Bayón y Sordo, 1985), lo que implica la posibilidad de que su liberación sea regulada por otros neurotransmisores.

Por otro lado, se observó que los efectos biológicos de las encefalinas son de corta duración. De hecho son inactivas por vía sistémica y cuando se aplican directamente en el cerebro la duración ($\bar{x} \pm D.S.$) de su efecto analgésico varía de 9 ± 1.8 min (met-enkefalina) a 12 ± 2.1 min (leu-enkefalina). Desde 1978 se encontró que, a un pH fisiológico, la biodegradación de las encefalinas ocurre rápidamente, por la acción de enzimas presentes en los sobrenadantes de tejidos como el cerebro, el hígado, el riñón y el plasma (Craves y cols, 1978; Malfroy y cols, 1978; Meek y cols, 1977).

La acción biodegradante se atribuyó al efecto de una aminopeptidasa soluble, la cual, en un primer paso, remueve el residuo N-terminal de la tirosina, en la unión Tir-Gli, esencial para la actividad biológica, dando lugar a un tetrapéptido inactivo (Gli-Gli-Fen-Met o Gli-Gli-Fen-Leu). Los elementos biodegradantes de las encefalinas se asociaron con todas las fracciones subcelulares, especialmente en el sobrenadante, en las membranas sinaptosomales y las fracciones nuclear y mitocondrial. También se les encontró en la fracción soluble de los homogenados del ileo de cobayo y en las células cultivadas de neuroblastoma (Hambrook y cols, 1976; Meek y cols, 1977). Por otro lado, se observó que estas enzimas son inhibidas, *in vitro*, por algunos metales pesados (Zn y Cd), por la administración de bloqueadores de grupos sulfhídricos y por algunos antibióticos. Así, se ha demostrado que la bacitracina (10 mcg/ml) impide la biodegradación de encefalinas en los homogenados de cerebro (Miller y cols, 1977). Esta acción protectora de la degradación también se ha reportado para la puromicina (Miller y cols, 1977; Simantov y Snyder, 1976; Meek y cols, 1977; Hambrook y cols, 1975), la cual inhibe la actividad de la arilamidasa cerebral.

También se propuso la participación de encefalinasas en los procesos de biodegradación. Se postuló que la encefalinasasa A rompe a las encefalinas en la unión Gli-Fen (Malfroy y cols, 1978; Gorenstein y Snyder, 1979); mientras que la encefalinasasa B lo hace en la unión Gli-Gli. Estas enzimas son inhibidas por los productos de la biotransformación y por sustancias como la d-fenilalanina (Della Bella y cols, 1979, bacitracina (Simmons y Ritzman,

1980), captopril (Stine y cols, 1981), tienfan (Roques y cols, 1980) y bestatina (Carenzi y cols, 1981). Estos inhibidores, administrados por vía intracerebroventricular, aumentan la actividad analgésica de la met-enkefalina exógena (Ehrenpreis, 1985). De hecho, la d-fenilalanina potencia el efecto de la met-enkefalina administrada por vía sistémica (Ehrenpreis, 1985).

Actualmente se acepta la existencia potencial de tres mecanismos para la biodegradación de las encefalinas, los cuales parecen regular la concentración de estos pentapeptidos en la vecindad de los receptores al ser responsables de la degradación de las encefalinas exógenas: 1) el rompimiento de la unión Tyr-Gli por acción de las aminopeptidasas solubles (Schnebli y cols, 1979; Sullivan y cols, 1978; Traficante y cols, 1980); 2) el rompimiento de la unión Gli-Fen o en la Gli-Gli por las dipeptidilcarboxipeptidasas o enkefalinasas A y B (Almenoff y cols, 1981; Malfroy y cols, 1979; Sullivan y cols, 1978; Benuck y Marks, 1980); 3) el rompimiento de la unión Gli-Fen por la enzima convertidora de angiotensina, aun cuando esta enzima no parece tener una participación significativa (Patey y cols, 1981; Schwartz y cols, 1981). Por otro lado, se ha sugerido que la aminopeptidasa soluble degrada a las encefalinas en el interior de las células, mientras que la enkefalinasasa A inactiva a las encefalinas liberadas localmente o presentes en la circulación (Hersh, 1982). Más recientemente, De la Baume confirmó que la enkefalinasasa A y las aminopeptidasas desempeñan un papel crítico en la inactivación de las encefalinas endógenas (32).

Los mecanismos de biodegradación de las endorfinas son menos conocidos. Son activas por vía sistémica (Loh y cols, 1976) y sus efectos se prolongan por varias horas cuando se aplican por vía intracerebroventricular (Hambrook y cols, 1976; Miller y cols, 1979). Las endorfinas parecen ser degradadas por enzimas presentes en las membranas sinaptosomales, ya que la incubación en rebanadas del cuerpo estriado de rata da lugar a la formación, dependiente del pH, de alfa-endorfinas, gamma-endorfinas, met-enkefalina y tirosina libre. La presencia de bacitracina en el medio no afecta la vida media de beta-endorfina, pero si aumenta la concentración de gamma-endorfina y reduce la tirosina libre, es decir, la bacitracina parece proteger a la gamma-endorfina de la acción de las aminopeptidasas.

Finalmente, es posible que la recaptura, al igual que en el caso de otros neurotransmisores, sea otro de los mecanismos fisiológicos para la terminación de la actividad de los péptidos opiáceos.

1.5 Participación en funciones fisiológicas y efectos farmacológicos de los péptidos opiáceos.

Como ya se señaló los opiáceos producen sus efectos biológicos más significativos sobre el SNC y sobre el tracto gastrointestinal. En tales sistemas sus acciones son muy variadas e incluyen analgesia, depresión respiratoria, somnolencia, cambios en el estado de ánimo, náusea, vómito, disminución de la motilidad gastrointestinal y alteraciones significativas en el funcionamiento del sistema nervioso autónomo y del endócrino. Tales efectos son consecuencia de interacciones con sitios de unión esteroespecíficos y saturables localizados en las células nerviosas. Su afinidad por tales receptores se correlaciona razonablemente con su potencia biológica, especialmente con la analgesia.

También se había señalado que los receptores opiáceos parecen ser el sitio de acción particular de los ligandos endógenos, y desde el descubrimiento de estos productos se consideró que las sustancias exógenas morfínicas producen sus efectos porque mimetizan las acciones de dichos ligandos. Un gran número de estudios se ha orientado a la identificación de los sistemas fisiológicos regulados, parcial o totalmente, por los péptidos endógenos y a la caracterización de sus efectos biológicos.

Los resultados de los estudios realizados durante los últimos diez años relacionan a los péptidos opiáceos con los mecanismos que regulan diversas funciones vitales (Tabla 1). Además de los esfuerzos por esclarecer su participación en los fenómenos de

TABLA I

ALGUNOS SISTEMAS FISIOLÓGICOS Y ALTERACIONES PATOLÓGICAS EN LOS QUE SE CONSIDERA QUE LOS SISTEMAS ENDOFINERGICOS ESTAN INVOLUCRADOS.

| | |
|----------------------------|----------------------------|
| DOLOR | SISTEMA INMUNE |
| RESPIRACION | TENSION EMOCIONAL |
| TEMPERATURA | MOTILIDAD GASTROINTESTINAL |
| REPRODUCCION | ENVEJECIMIENTO |
| CONDUCTA SEXUAL | ESQUIZOFRENIA |
| CONSUMO DE AGUA Y ALIMENTO | DEPRESION PSIQUICA |
| APRENDIZAJE Y MEMORIA | CONVULSIONES |
| LIBERACION DE HORMONAS | DEPENDENCIA |
| HIPOTALAMO-HIPOFISIARIAS | |
| CONDUCTA SOCIAL | OBESIDAD |

dolor y analgesia, destacan aquellos que pretenden determinar el grado de participación de los sistemas endorfinérgicos y encefalinérgicos en las respuestas a la tensión emocional, especialmente la analgesia inducida por ésta (Kameyama y cols, 1985; Appelbaum y Holtzman, 1985), en los procesos de aprendizaje y memoria (Gallagher y cols, 1985; Zhang y cols, 1987), en los fenómenos de tolerancia y dependencia (Jhamandas, 1985, Weissman y Zamir, 1987), entre otros. En la última revisión de Olson (1989) se concluye que si bien durante los últimos años ha habido avances considerables en la comprensión de los procesos fisiológicos supuestamente controlados o regulados por los péptidos endógenos, los resultados no son consistentes y que, en ocasiones, son tan contradictorios que no se justifican en este momento las generalizaciones ni las respuestas definitivas (110).

Por su relación con el objetivo de este trabajo sólo se analizarán los datos más significativos sobre el efecto analgésico y locomotor de los opioides endógenos.

Considerando que la analgesia es el efecto más importante de la morfina, muchos de los estudios iniciales con los péptidos opioides intentaron establecer sus propiedades analgésicas. La presencia de receptores opioceos y de péptidos opioides en estructuras relacionadas con las vías de dolor también dieron fundamento a esta posibilidad. Pronto se reportó que tanto las encefalinas como las endorfinas producen analgesia en los animales de laboratorio cuando se depositan en los ventrículos cerebrales. Se encontró que el efecto antinociceptivo de las

encefalinas es considerablemente inferior al de la morfina y su acción relativamente transitoria (Belluzzi y cols, 1976; Buscher y cols, 1976), lo cual fue explicado por la rápida biotransformación de estos péptidos (Chang y cols, 1976). En contraste, se encontró que la beta-endorfina tiene propiedades analgésicas muy potentes en diversos modelos experimentales y que, de hecho, es considerablemente más potente que la morfina (Wei y cols, 1977). La analgesia producida por estos péptidos es rápidamente revertida por la naloxona. También se encontró que los análogos modificados de las encefalinas, protegidos contra la biodegradación, son tan potentes como la beta-endorfina (Wei y cols, 1977). Los estudios sistematicos, utilizando varios modelos experimentales y la vía intracerebroventricular, permitieron establecer su potencia analgésica relativa (Wei y cols, 1977; Romer y cols, 1977; Frigeri y cols, 1978). La tabla II resume los resultados de esos estudios.

TABLA II

POTENCIA ANALGESICA DE LOS PEPTIDOS OPIACEOS

| OPIACEO | POTENCIA COMPARADA CON LA MORFINA |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| MORFINA | 1 |
| BETA-ENDORFINA | 10-100 |
| MET-ENCEFALINA | <0.1 |
| LEU-ENCEFALINA | <0.1 |
| ANALOGOS DE LAS ENCEFALINAS | <1->100 |

Es importante mencionar que los efectos analgésicos de los péptidos opiáceos, que se efectúan a través de diversos receptores, usualmente se acompañan de otros efectos; de ellos conviene mencionar: hiperactividad, catatonía, sacudidas y signo de Straub, los cuales también son antagonizados por la naloxona (Bloom y cols, 1976; Jacquet y Marks, 1976; Tseng y cols, 1979).

Por otro lado, la morfina y sus congéneres producen efectos diversos sobre la conducta, los cuales varían de acuerdo a la dosis, vía de administración y especie observada. En general, la actividad global, medida a través de la actividad locomotora, aumenta con dosis pequeñas y disminuye con dosis elevadas. Su propiedad de aumentar la actividad locomotora es muy característica en los ratones y desde 1963 la medición de dicha actividad constituye una de las estrategias más importantes y sencillas para el estudio de los efectos opiáceos (Schuster y cols, 1963). En esta especie animal su efecto es aparente con dosis de 10 mg/kg y las dosis elevadas (100 mg/kg) producen un aumento del orden de 10 a 15 veces sobre la actividad basal (Rethy y cols, 1971); tal incremento implica que estos animales, bajo el efecto de la morfina, mantienen un desplazamiento continuo y acelerado, de tipo anfetamínico, que persiste, con las dosis altas, por más de 2 hs. Esta hiperactividad, aun cuando menos intensa, también se observa en ratas (Galina y Amit, 1985) y su efecto es más bien bífásico en otras especies animales (Schnur, 1985).

El efecto locomotor de los opiáceos se ha utilizado comparativamente para el estudio de los péptidos endógenos; se ha observado que el efecto de las encefalinas depende del sitio de aplicación. Cuando se administran en el área ventral **tegmental** o en el núcleo **accumbens** producen aumento de la actividad locomotora (Kalivas, 1985; Kalivas y Bronson, 1985). En contraste, producen sedación e hipoactividad cuando se depositan por vía intracerebroventricular. En otras áreas pueden producir hipoactividad seguida de hiperactividad (Havemann y Kuschinsky, 1985).

Por vía sistémica, la beta-endorfina produce la hipermotilidad característica de la morfina (Yehuda y Sheleff, 1985); sin embargo, por vía intracerebroventricular produce sedación o catalepsia (Itho y Katsuura, 1985; Nistico y cols, 1985). El efecto de otros péptidos opiáceos es muy variable y pueden producir aumento o disminución de la locomoción.

Finalmente, es importante subrayar que el efecto locomotor de la morfina es revertido por los antagonistas opiáceos (Corrigan y cols, 1986); sin embargo, este antagonismo no es consistente y existen resultados muy contradictorios (Willis, 1987; Kavaliers e Innes, 1987). De la misma manera, se ha observado que los antagonistas opiáceos pueden o no revertir los efectos de los péptidos endógenos (Friederich y cols, 1987; Ford y cols, 1986).

I. 6 Planteamiento del problema, hipótesis de trabajo y objetivos del estudio

La información acumulada demuestra claramente la presencia de péptidos opioides en el Sistema Nervioso Central y Periférico de los mamíferos. Dichas sustancias forman parte de un sistema muy complejo y se les considera relacionadas con diversas funciones orgánicas y con algunos estados patológicos. Sin embargo, la evidencia disponible no es totalmente categórica y se continúan los estudios que pretenden desentrañar su significado biológico.

Numerosos reportes sugieren que los péptidos opioides, específicamente las encefalinas, actúan como neurotransmisores. Como tales, siguen un proceso de síntesis, almacenamiento, liberación y degradación. En relación a la última etapa, en el cerebro se ha demostrado la existencia de sistemas muy eficaces de bioinactivación que determinan que sus efectos sean de muy corta duración. La bioinactivación parece depender de enzimas específicas y se ha demostrado que diversos fármacos son capaces de inhibir la actividad enzimática y prolongar la actividad biológica de las encefalinas.

Los estudios iniciales sobre la existencia de fármacos capaces de inhibir *in vitro* los sistemas enzimáticos que degradan las encefalinas dió origen a la idea de buscar sustancias químicas que en modelos *in vivo* produjeran los mismos efectos. En una serie de experimentos preliminares, llevados a cabo en el Departamento de Farmacología, se observó que la cicloheximida, un

antibiótico que inhibe la síntesis proteica, produce efectos de tipo opioide en el ratón; observación que dió origen a este proyecto.

El interés creciente por este tipo de inhibidores no sólo depende de la importancia de esclarecer las vías de transformación de los lípidos endógenos, también está determinado por la búsqueda de fármacos capaces de elevar los niveles de endorfinas en el cerebro y producir un efecto analgésico intenso y prolongado. Tales sustancias pueden convertirse en un nuevo tipo de analgésicos y de psicotrópicos. Por todo lo anterior, se plantearon los objetivos e hipótesis de trabajo que dieron lugar a esta tesis.

a. Objetivos

Los objetivos principales de estas investigaciones fueron:

1. Determinar si una serie de antibióticos, capaces de inhibir la síntesis proteica a través de diferentes mecanismos, producen en los roedores efectos de tipo opioideo.
2. Si tal es el caso, determinar si la naloxona, un antagonista de fármacos opiáceos, es capaz de prevenir o de revertir los efectos observados.

b. Hipótesis

La información disponible sobre el tema permite suponer:

1. Que algunos inhibidores de la síntesis proteica, al disminuir la formación y actividad de las enzimas encargadas de la biodegradación de las encefalinas, producen efectos biológicos de tipo opioideo.

2. Si los efectos biológicos inducidos por tales sustancias tienen una base opiácea, pueden ser prevenidos o revertidos por los antagonistas de los narcóticos.

II. METODOS Y RESULTADOS

1. Susceptibilidad de tres cepas de ratones al efecto locomotor de la morfina.

1.1 Métodos

El primer grupo de experimentos fué diseñado con el propósito de determinar cual de las cepas de ratón disponibles en el Bioterio de la Facultad de Medicina es más susceptible al efecto locomotor de la morfina. La actividad locomotora de los ratones se registró mediante el sistema electrónico de cuantificación de actividad locomotora (SECAL) diseñado y construido en el Departamento de Farmacología*. Este equipo consta de tres ruedas de 30 cm de diámetro, cada uno tiene cuatro sistemas independientes de fotoceldas conectadas a contadores digitales para el registro automático del número de interrupciones del haz de luz. Tal dispositivo está instalado en el interior de una cámara oscura, sonoamortiguada, provista de ventana unidireccional.

Se utilizaron ratones macho, adultos, de 20 a 30 g de peso de las cepas Taconic, CD-1 y C-57-Black, mantenidos en condiciones ambientales de luz-obscuridad 12/12 h, con acceso libre al agua y alimento hasta el momento de los experimentos, los cuales se llevaron a cabo entre las 8:00 y las 14:00 hrs. En cada caso, los animales se distribuyeron al azar en 5 subgrupos y la morfina se administró en dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg por vía subcutánea.

* Ing. Luis Beltrán del Río

Se utilizaron 5 ó 6 animales por dosis y los grupos testigos recibieron solución salina. En todos los casos el volumen administrado fue de 0.1ml/10g de peso. Inmediatamente después de la inyección, los animales se colocaron individualmente en el SECAL y la actividad locomotora se registró continuamente durante 30 min, obteniendo cuentas parciales cada 2 min.

1.2 Resultados

Las Figs. 5, 6 y 7 muestran el curso temporal del efecto de la morfina sobre la actividad locomotora de las 3 cepas de ratón estudiadas. Para las cepas Taconic y C-57-Black la dosis mínima requerida para alterar la actividad locomotora fue de 10 mg/kg; en contraste, en la cepa CD-1 el incremento en la actividad locomotora fue aparente con dosis de 30 mg/kg. En todos los casos el aumento de la actividad locomotora tuvo relación con la dosis administrada y el efecto fue aumentando progresivamente a lo largo del experimento, excepto los ratones C-57-Black que recibieron la dosis alta de morfina (100 mg/kg), en cuyo caso el efecto máximo se registró a los 10 min después de la inyección (Fig. 7).

En los tres casos se determinó el número de cuentas totales para los 30 minutos de registro. En las Figs. 5, 6 y 7 puede apreciarse claramente que el aumento de la actividad locomotora total es dependiente de la dosis de morfina. El análisis estadístico (prueba t de Student) reveló aumento significativo ($p < 0.05$) de la actividad locomotora, en relación al grupo testigo, con las dosis de 10.0, 30.0 y 100.0 mg/kg de morfina en las cepas Taconic y C-57-Black, y con las dosis de 30.0

y 100.0 mg/kg en los animales de la cepa CD-1. Con los mismos datos se construyeron las curvas dosis-efecto que se muestran en la Fig. 8. En esta figura puede apreciarse que con todas las dosis probadas el efecto de la morfina es mayor en los ratones C-57-Black; así mismo, que la curva dosis-efecto obtenida en esta cepa de ratones está desplazada a la izquierda, de 3 a 5 veces de las cepas CD-1 y taconic, respectivamente.

Estos resultados determinaron la selección de los ratones C-57-Black para los experimentos ulteriores.

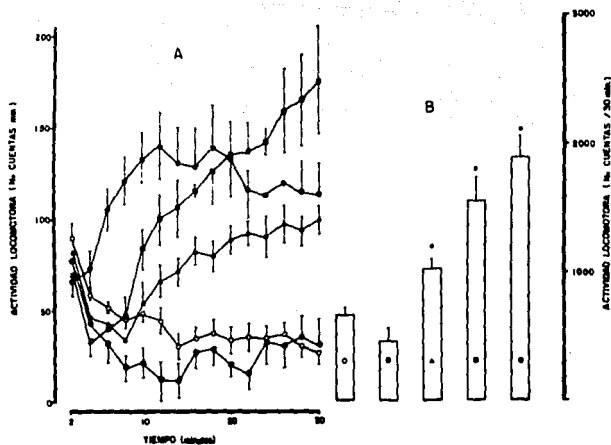


Figura 5. Efecto de la morfina sobre la actividad locomotora de ratones de la cepa Taconic. A, curso temporal del efecto; B, efecto sobre la actividad locomotora total (sesiones de 30 min). En ambas graficas: ○, actividad locomotora de los ratones control que recibieron solución salina; efecto de la administración de morfina en dosis de 3.0 (●), 10.0 (▲), 50.0 (●) y 100.0 (✱) mg/kg, s.c. Cada punto representa la media de 6 determinaciones y las líneas verticales la desviación tipo.

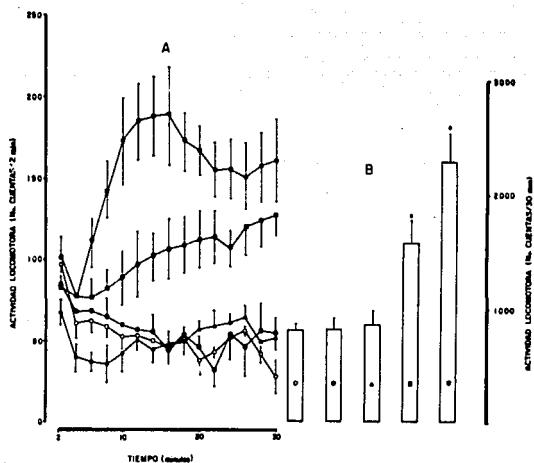


Figura 6. Efecto de la morfina sobre la actividad locomotora de ratones de la cepa CD-1. A, curso temporal del efecto; B, efecto sobre la actividad locomotora total (sesiones de 30 min). En ambas gráficas: ○, actividad locomotora de los ratones control que recibieron solución salina; el efecto de la administración de morfina en dosis de 3.0 (●), 10.0 (▲); 30.0 (■) y 100.0 (◆) mg/kg, s.c. Cada punto representa la media de 6 determinaciones y las líneas verticales la desviación tipo.

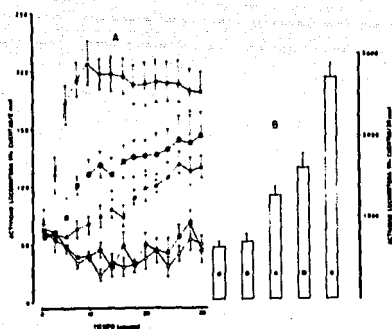


Figura 7. Efecto de la morfina sobre la actividad locomotora de ratones de la cepa C-57-Black. A, curso temporal del efecto; B, efecto sobre la actividad locomotora total (sesiones de 30 min). En ambas gráficas: ○, actividad locomotora de los ratones control que recibieron solución salina; el efecto de la administración de morfina en dosis de 3.0 (●), 10.0 (▲), 30.0 (■) y 100.0 (★) mg/kg, s.c. Cada punto representa la media de 6 determinaciones y las líneas verticales la desviación tipo.

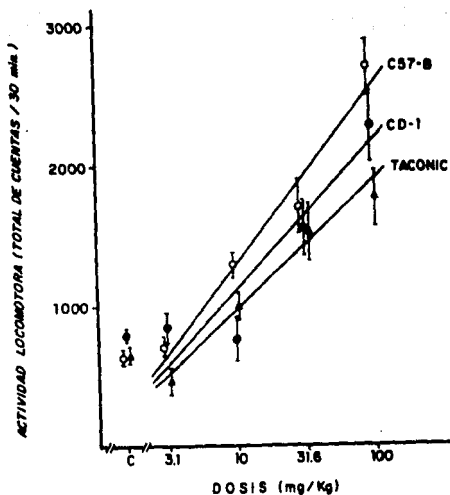


Figura 8. Relación dosis-efecto de la morfina sobre la actividad locomotora de ratones de la cepa C-57-Black (o), CD-1 (●) y Taconic (▲). En cada caso se muestra la línea de regresión estimada, cada punto representa la media de 6 determinaciones y las líneas verticales los errores tipo. Las abscisas muestran las dosis empleadas de morfina; las ordenadas, el total de cuentas en sesiones de 30 min.

2. Efecto de diversos fármacos sobre la actividad locomotora del ratón. Influencia del pretratamiento con naloxona.

2.1 Métodos

Se utilizaron ratones macho, adultos, de 20 a 30 g de peso, de la cepa C-57-Black, mantenidos en las condiciones que se indican en la sección anterior.

En un primer grupo de experimentos se determinó el efecto sobre la actividad locomotora, medida como se describe previamente, de los siguientes fármacos: cicloheximida, bacitracina, cloranfenicol, anisomicina, puromicina y dehidroemetina; los cuales se administraron por vía i.o. a 5 niveles de dosis (37.5, 75, 150, 300 y 600 mg/kg), utilizando 10 animales por dosis. Los animales control recibieron solución salina (testigos para bacitracina, anisomicina, puromicina, dehidroemetina) o carboximetilcelulosa al 0.2% (grupos testigos para cicloheximida y cloranfenicol). En todos los casos el volumen de administración fue de 0.1 ml por 10 g de peso. Los animales se introdujeron al SECAL inmediatamente después de la administración y la actividad locomotora se registro durante 30 min.

En la segunda serie de experimentos un grupo de ratones fue inyectado por vía subcutánea con naloxona (1 mg/kg, s.c.) 15 min antes de la administración de morfina (3.1 a 100 mg/kg, i.p.). Otro grupo de animales recibió el antagonista de narcóticos (10 mg/kg, s.c.) 15 min antes de la administración intraperitoneal de cicloheximida (37.5 a 300 mg/kg) o de bacitracina (37.5 a 600 mg/kg). Los animales control recibieron el vehículo

correspondiente (0.1 ml/10 g de peso). Un min después de la inyección correspondiente, los animales fueron colocados en SECAL y se registro la actividad locomotora durante 30 min.

2.2. Resultados

En la Tabla III puede observarse que solo la cicloheximida aumento significativamente la actividad locomotora total del ratón. El efecto fué aparente con las dosis de 37.5 mg/kg y máximo con la dosis de 300 mg/kg; sin embargo, su efecto máximo fue claramente inferior al producido por la morfina. Por otro lado, la bacitracina disminuyó claramente la actividad locomotora con todas las dosis probadas. En el caso de la anisomicina, la puromicina y la dehidroemina la disminución de la actividad locomotora fué muy marcada, particularmente con las dosis de 150 a 300 mg/kg, las cuales producen efectos tóxicos muy severos en el ratón. En la misma tabla puede observarse que el cloranfenicol no modificó la actividad locomotora.

TABLA III

EFECTO DE DIVERSOS FARMACOS SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE RATONES C-57-Blac1

| FARMACO | CONTROL | ACTIVIDAD | | | | |
|----------------|-------------|--|---------------|----------------|----------------|------------|
| | | \bar{X} CUENTAS/30 MIN (DESVIACION TIPO) | | | | |
| | | DOSIS (mg/kg, ip) | | | | |
| | | 37.5 | 75 | 150 | 300 | 600 |
| CICLOHEXIMIDA | 386 (74) | 457 (143) | 568* (82) | 673* (90) | 896* (130) | -- |
| BACITRACINA | 300 (90) | 166 (110) | 120 (80) | 100 (40) | 54 (26) | 32 (12) |
| ANISOMICINA | 329 (85) | 115 (59) | 37 (12) | 0 | 0 | 0 |
| PURORICINA | 304 (52) | 120 (35) | 45 (18) | 0 | 0 | 0 |
| DEILDROEMETINA | 308 (77) | 115 (55) | 42 (32) | 15 (7) | 0 | 0 |
| CLORAFENICOL | 329 (85) | 414 (101) | 385 (93) | 310 (97) | 317 (94) | -- |
| | | 5.1 | 10 | 31 | 100 | |
| MORFINA | 640 (6) | 720 (50) | 1300* (80) | 1700* (200) | 2700* (190) | |

* $p < 0.05$ (Solo se consideraron los aumentos de la actividad locomotora y no su disminución)

La figura 5 muestra el curso temporal del efecto de la cicloheximida sobre la actividad locomotora del ratón. Puede observarse que el efecto motor fue inmediato (2 a 6 min), particularmente con las dosis altas (150 y 300 mg/kg), mantuvo relación con la dosis administrada, y declinó progresivamente y en forma regular a lo largo de la sesión. El análisis estadístico reveló un aumento significativo ($p < 0.05$) de la actividad locomotora con la dosis de 75, 150 y 300 mg/kg. En la figura 10 se observa que la disminución de la actividad locomotora producida por la bacitracina fue inmediata, que guardó cierta relación con la dosis, y que se mantuvo a lo largo de los 30 min de registro.

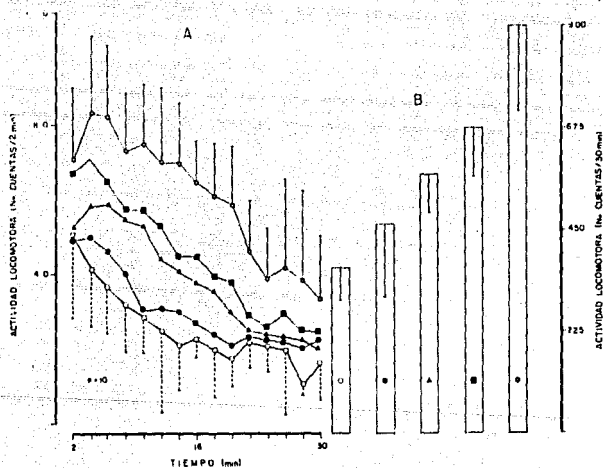


Figura 9. Efecto de la cicloheximida sobre la actividad locomotora de ratones C-57-Black. A, curso temporal del efecto; B, efecto sobre la actividad locomotora total (sesiones de 30 min). En ambas gráficas: O, actividad locomotora de los ratones control que recibieron metilcelulosa al 0.2%; el efecto de la administración de la cicloheximida en dosis de 37.5 (●), 75.0 (▲), 150.0 (■) y 300.0 (✱) mg/kg, s.c. Cada punto representa la media de 6 determinaciones y las líneas verticales la desviación tipo.

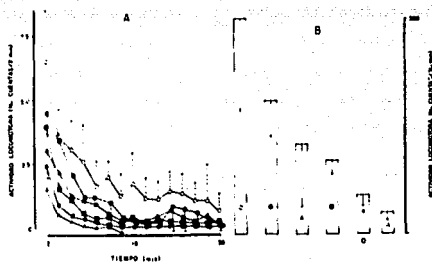


Figura 10. Efecto de la bacitracina sobre la actividad locomotora de ratones C-57-Black. A, curso temporal del efecto; B, efecto sobre la actividad locomotora total (sesiones de 30 min). En ambas gráficas: O, actividad locomotora de los ratones control que recibieron metilcelulosa al 0.2%; el efecto de la administración de la bacitracina en dosis de 37.5 (●), 75.0 (▲), 150.0 (●), 300.0 (●) y 600.0 (▲) mg/kg, s.c. Cada punto representa la media de 6 determinaciones y las líneas verticales la desviación tipo.

Estos resultados demuestran que, de los fármacos probados, sólo la cicloheximida es capaz de aumentar la actividad locomotora del ratón; asimismo, que para este efecto, la cicloheximida es aproximadamente 60 veces menos potente que la morfina (Fig. 11).

Por otro lado, se encontró que el pretratamiento con naloxona (1 mg/kg) impidió el aumento de la actividad locomotora de la morfina (Fig. 12). De hecho, la actividad locomotora de los animales que recibieron naloxona más morfina en dosis bajas (3.1 y 10 mg/kg) fue ligeramente inferior a la de los animales control. El antagonista de narcóticos (10 mg/kg) también inhibió claramente el aumento en la actividad locomotora producida por la cicloheximida (Fig. 12). Además, la naloxona no modificó las alteraciones en la actividad locomotora producidos por bacitracina.

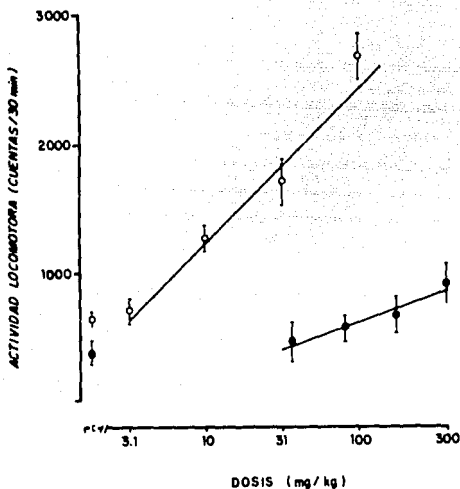


Figura 11. Relación dosis-efecto de la morfina (○) y de la cicloheximida (●) sobre la actividad locomotora de ratones de la cepa C-57-Black. En cada caso se muestra la línea de regresión estimada, cada punto representa la media de 6 determinaciones y las líneas verticales los errores tipo. Las abscisas muestran las dosis empleadas de morfina y de cicloheximida; las ordenadas, el total de cuentas en sesiones de 30 min.

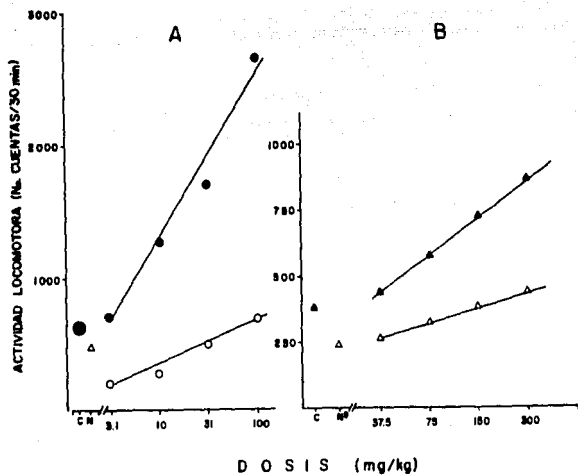


Figura 12. Efecto del pretratamiento con naloxona sobre el efecto locomotor producido por la morfina (A) y la cicloheximida (B) en el ratón. En cada caso se muestra la línea de regresión estimada en los animales pretratados con solución salina (● y ▲) o con naloxona (○ y △) 15 min antes de la administración de morfina o de cicloheximida.

3. Actividad antinociceptiva en el ratón. Influencia del pretratamiento con naloxona.

3.1 Métodos

a. Pinza arterial

Se utilizaron ratones machos, de la cepa Taconic, de 20 a 30 g de peso, mantenidos en condiciones ambientales constantes (luz-obscuridad 12:12, 22[±] 1 °C) durante una semana, con libre acceso al agua y alimento. Los experimentos se llevaron a cabo de las 16 a las 20 hs. Se utilizó el método de Haffner (57), modificado por Bianchi y Franceschini (14). Se aplicó la pinza arterial a 1 cm de la base de la cola de los ratones y sólo fueron seleccionados aquellos cuya respuesta (mordisqueo de la pinza) ocurrió en un lapso de 10 seg después de su aplicación. En este estudio se consideró efecto antinociceptivo cuando no se observó mordisqueo de la pinza en el lapso de 10 seg a partir de su aplicación.

En una primer serie de experimentos se determinó el efecto de la morfina (0.1, 0.3, 1.0 y 3.1 mg/kg), cicloheximida, cloranfenicol, anisomicina, puromicina, dehidroemetina y bacitracina (37.5, 75.0, 150.0, 300.0 y 600.0 mg/kg). Excepto en el caso de la bacitracina (5 animales por dosis), se utilizaron 10 animales por cada una de las dosis señaladas. Los fármacos en estudio o el vehículo correspondiente (0.1 ml/10 g) se administraron por vía subcutánea y el efecto antinociceptivo se determinó a los 15, 30, 60 y 90 min después de la inyección. Los animales control recibieron solución salina o carboximetilcelulosa al 0.2%. Para cada fármaco se estableció el curso temporal del

efecto antinociceptivo y la DE_{50} fue calculada por el método de Litchfield y Wilcoxon (94) en el momento del efecto máximo.

En una segunda serie de experimentos, los ratones, seleccionados como arriba se indica, fueron pretratados con 1 mg/kg, de naloxona vía s.c., 15 min antes de la administración de morfina (0.1 a 3.1 mg/kg)); o con 10 mg/kg, vía s.c., del antagonista de narcóticos 15 min antes de la inyección de cicloheximida o bacitracina (37.5 a 600.0 mg/kg). El efecto antinociceptivo, medido como arriba se indica, se determinó a los 15, 30, 60 y 90 min después de la administración de los fármacos en estudio.

b. Plancha caliente

Se siguió el procedimiento descrito por Woolfe y McDonald (167), empleando un aparato marca Sacrel, modelo DS35, constituido por una placa metálica conectada a una resistencia eléctrica, un segundero digital con interruptor de pedal y un cilindro transparente de 18 cm de diámetro y 25 cm de altura. La temperatura de la plancha se fijó a 55 °C y se consideró como respuesta nociceptiva el lamido de la cara plantar de cualquiera de las patas dentro de un lapso de los 20 seg inmediatos a la colocación del animal sobre la plancha. Los experimentos se llevaron a cabo entre las 16 y las 20 hs y los animales fueron utilizados en una sola ocasión.

En este estudio también se utilizaron ratones macho, de la cepa Taconic, con las características descritas y mantenidos en las

condiciones ambientales idénticas. Grupos de 10 ratones fueron inyectados por vía subcutánea con morfina (3.1, 10.0, 31.0 y 100 mg/kg), cicloheximida, bacitracina (37.5, 75.0 y 150.0 mg), o los vehículos correspondientes, y la respuesta al estímulo nociceptivo se determinó en cada uno de los animales a los 15, 30, 60 y 90 min después de la inyección. En los casos en los que la respuesta nociceptiva no se presentó en el lapso de 20 seg, los animales permanecieron sobre la plancha caliente hasta que mostraron la respuesta establecida (lamido de las patas). La DE₅₀ fue calculada como antes se indica; para este cálculo sólo se consideró la presencia o no de respuesta en el lapso de 20 seg.

c. Estiramiento corporal inducido por acetilcolina

Esta prueba se realizó mediante el procedimiento descrito por Collier y cols. (25). Se utilizaron ratones hembra, adultos, de 15 a 25 g de peso, de la cepa Taconic, mantenidos en las condiciones ambientales descritas. Al igual que en las pruebas anteriores, los experimentos se llevaron a cabo de las 16 a las 20 hs. Los fármacos en estudio, o el vehículo correspondiente, se administraron por vía subcutánea 20 min antes de la inyección intraperitoneal de acetilcolina (4 mg/kg). Inmediatamente después, los ratones fueron colocados en el interior de un cilindro de cristal transparente (25 cm de diámetro x 10 cm de altura) y se determinó la presencia de estiramientos corporales, en un lapso de 3 min, en respuesta a la administración de acetilcolina.

En un primer grupo de experimentos se estudio el efecto de la morfina (0.1., 0.31, 1.0, 3.1 y 10 mg/kg), cicloheximida, bacitracina, puromicina, cloranfencol, anisomicina y

dehidroemetina (37.5, 75, 150, 300 y 600 mg/kg) sobre el estiramiento corporal inducido por la acetilcolina, utilizando 10 animales por dosis.

En el segundo grupo de experimentos los animales fueron pretratados con naloxona 1 mg/kg, s.c. 15 min antes de la administración de morfina; o con 10 mg/kg, s.c., del antagonista 15 min antes de la administración de cicloheximida o bacitracina, a las dosis antes indicadas.

Finalmente, y con el propósito de determinar la especificidad del efecto antinociceptivo en la prueba de estiramiento corporal, se exploró la capacidad de los fármacos en estudio para producir incoordinación muscular. Se utilizó un cilindro giratorio de 2.5 cm de diámetro y una velocidad de 10 rpm (marca Ugo Basile, accelerating rotarod 7650). La morfina (0.1, 0.31, 1.0, 3.1 y 10.0 mg/kg), la bacitracina y la cicloheximida (37.5, 75, 150, 300 y 600 mg/kg), o los vehículos correspondientes, fueron administrados por vía subcutánea y los animales se colocaron individualmente sobre el cilindro 20 min después de la inyección. Durante los primeros 10 seg la velocidad inicial fué de 2 rpm, e inmediatamente después se cambió a 10 rpm. Se emplearon 10 animales por dosis y se determinó el número de animales incapaces de permanecer sobre el cilindro por un período de 120 seg. Mediante la prueba de Litchfield y Wilcoxon (94) se calculó la DE₅₀ para producir incoordinación muscular.

3.2 Resultados

Sólo la morfina y la cicloheximida mostraron actividad antinociceptiva en los tres modelos experimentales de dolor utilizados en este estudio. El efecto de la morfina fue aparente a los 15 min y máximo a los 30 min, para después declinar progresivamente, excepto con la dosis altas (10.0 mg/kg), cuyo efecto máximo se mantuvo durante los 90 min del experimento (Fig. 13). Cabe subrayar que con las dosis más elevadas (3.1 y 10.0 mg/kg) se presentó el efecto antinociceptivo en el 100% de los animales tratados. En el caso de la cicloheximida, el efecto antinociceptivo fue aparente a los 15 min y máximo, para la mayoría de las dosis, a los 60 min y declino, excepto para la dosis alta (600 mg/kg), a los 90 min (Fig. 14). Con la dosis más alta (600 mg/kg) solo se logró efecto en el 75% de los animales tratados. Con ambos fármacos, la magnitud y la duración del efecto guardó relación con la dosis administrada (Figs. 13 y 14).

La Tabla IV describe la DE_{50} de la morfina y de la cicloheximida en los 3 modelos experimentales empleados. Como puede observarse, la cicloheximida es de 63 (plancha caliente) a 450 (pinza arterial) veces menos potente que la morfina para bloquear la respuesta conductual a estímulos nociceptivos. Es pertinente resaltar que el efecto antinociceptivo de la morfina se logra en dosis substancialmente inferiores (4.18 veces) a aquellas que producen incoordinación muscular (Tabla V). En contraste, el efecto de la cicloheximida ocurre con dosis que producen alteraciones de la coordinación muscular (Tabla V).

TABLA IV
 ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE LA MORFINA, CICLOHEXIMIDA Y
 BACITRACINA

DE₅₀ y límites de confianza 95 (mg/kg, vía s.c.)

| FARMACO | PINZA ARTERIAL | PLACA CALIENTE | ESTIRAMIENTO CORPORAL |
|---------------|--------------------|----------------------|--------------------------|
| MORFINA | 0.25 (0.1-0.5) | 1.3 (0.7-2.6) | 0.98 (0.35-2.70) |
| CICLOHEXIMIDA | 112.50 (75-168) | 82.0 (56.6-118.9) | 159.6 (99.74-260.48) |
| BACITRACINA | 240.0 (120-480) | -- | 212.0 (158.8-294.4) |

--: No mostró actividad

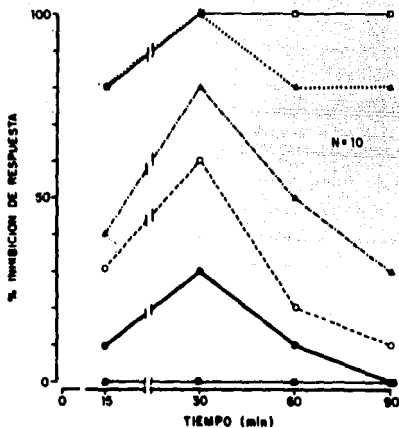


Figura 13. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la morfina en la prueba de la pinza arterial. Los resultados obtenidos en los animales control (■) se comparan con aquellos que recibieron morfina por vía subcutánea en dosis de 0.1 (●), 0.31 (○), 1.0 (△), 3.1 (▲) y 10.0 (◼) mg/kg. La ordenada señala la magnitud del efecto antinociceptivo, expresado en porcentaje de animales sin respuesta a la aplicación de la pinza arterial; la abscisa, el tiempo en min después de la administración.

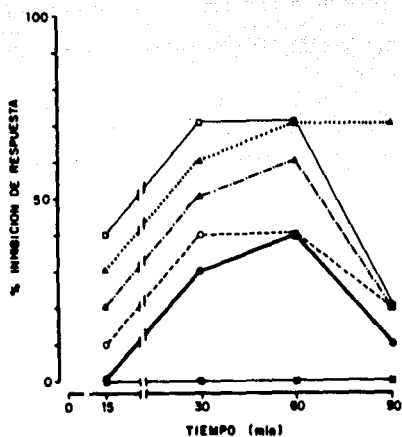


Figura 14. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la cicloheximida en la prueba de la pinza arterial. Los resultados obtenidos en los animales control (●) se comparan con aquellos que recibieron cicloheximida a las dosis de 37.5 (○), 75.0 (◻), 150.0 (△), 300.0 (◼) y 600 (◻) mg/kg, s.c. Para ver otros detalles ver la figura 9.

TABLA V

DE₅₀ DE LA MORFINA Y DE LA CICLOHEXIMIDA EN LAS PRUEBAS DE ESTIRAMIENTO CORPORAL Y CILINDRO GIRATORIO

| FARMACO | ESTIRAMIENTO CORPORAL (A) | CILINDRO GIRATORIO (B) | COCIENTE B/A |
|---------------|--|--|--------------|
| | DE ₅₀ y LC ₀₅ (mg/kg, s.c.) | DE ₅₀ y LC ₀₅ (mg/kg, s.c.) | |
| MORFINA | 0.98 (0.35-2.70) | 4.1 (1.79-9.34) | 4.18 |
| CICLOHEXIMIDA | 159.60 (99.74-260.48) | 90.0 (48-180.00) | 0.56 |

La bacitracina mostró cierta actividad antinociceptiva en las pruebas de la pinza arterial y del estiramiento corporal inducido por acetilcolina. Con las dosis altas (300 y 600 mg/kg) su efecto máximo ocurrió en 15 min y declinó hasta prácticamente desaparecer a los 90 min. Con las dosis bajas se instaló lentamente. En ambas pruebas, fue considerablemente (216 a 960 veces) menos activo que la morfina (Tabla IV).

Ninguno de los otros fármacos probados (cloranfenicol, anisomicina, puromicina, dehidroemetina) mostró actividad antinociceptiva.

Finalmente, la naloxona, en dosis de 1 y 10 mg/kg, antagonizó claramente el efecto antinociceptivo de la morfina y de la cicloheximida en los tres modelos experimentales (Tabla VI). También antagonizó, en dosis de 10 mg/kg, los efectos antinociceptivos de la bacitracina en los modelos de la pinza arterial y del estiramiento corporal inducido por acetilcolina.

TABLA VI

ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE LOS FARMACOS EN ESTUDIO (A). INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO CON NALOXONA (B)*

| DE ₅₀ y límites de confianza 95 (mg/kg, vía s.c.) | | | | | | |
|--|--------------------|-------------------|----------------------|-------|------------------------|------------------|
| FARMACOS | PINZA ARTERIAL | | PLACA CALIENTE | | ESTIRAMIENTO CORPORAL | |
| | A | B | A | B | A | B |
| MORFINA | 0.25 (0.1-0.5) | 8.4 (2.8-24.8) | 1.3 (0.6-2.6) | >10.0 | 0.98 (0.3-2.7) | 2.8 (0.9-7.9) |
| CICLO- HEXIMIDA | 112.5 (75-168) | >600 | 82.0 (56.6-118.9) | >300 | 159.6 (99.7-260.4) | >600 |
| BACITRA- CINA | 240.0 (120-480) | >600 | -- | + | 212.0 (152.8-294.4) | >600 |

* = Pretratamiento, 1 mg/kg (para morfina) ó 10 mg/kg (para cicloheximida y bacitracina)

+ = No se efectuó la prueba de antagonismo, porque no mostró actividad (---)

4. Toxicidad Aguda

4.1 Métodos

Se utilizaron ratones macho, de la cepa Taconic, adultos de 20 a 30 g de peso. En un primer grupo de experimentos los animales fueron inyectados intraperitonealmente con morfina (50-400 mg/kg), cicloheximida (37.5-1200 mg/kg), bacitracina (37.5-800 mg/kg) o naloxona (3-1000 mg/kg). Se utilizaron 10 animales por dosis. Inmediatamente después de la administración los animales fueron colocados en sus jaulas, con libre acceso al agua y alimento. La DL₅₀ se calculó como antes se indica, tomando los resultados observados al término de un período de 24 hs de observación.

En un segundo grupo de experimentos los animales fueron pretratados 15 min antes con naloxona en dosis de 1 mg/kg, s.c. antes de la inyección i.p. de morfina (50-400 mg), o de 10 mg/kg, s.c. antes de la administración de cicloheximida (37.5-1200 mg/kg) o bacitracina (37.5-800 mg/kg). La letalidad se calculó, como arriba se indica, al término de un período de 24 hs.

4.2 Resultados

Considerando las muertes ocurridas dentro del período de 24 hs, la morfina y la naloxona fueron moderadamente más tóxicas que la cicloheximida y la bacitracina (Tabla VII). Por otro lado, el pretratamiento con naloxona disminuyó claramente la letalidad aguda de morfina, bacitracina y cicloheximida.

TABLA VII
 TOXICIDAD AGUDA DE LOS FARMACOS EN ESTUDIO (A). INFLUENCIA DEL
 PRETRATAMIENTO CON NALOXONA (B).

| FARMACO | DL ₅₀ y límites de confianza 95% (mg/kg, i.p.) | |
|---------------|---|-------|
| | A | B |
| MORFINA | 188.9 (146.2-242.9) | >400 |
| CICLOHEXIMIDA | 840.0 (744-911.4) | >1000 |
| BACITRACINA | 565.0 (396-405) | >800 |
| NALOXONA | 290.0 (166-505) | |

5. Fármacos empleados.

Las sustancias empleadas fueron sulfato de acetilcolina, cicloheximida, bacitracina, anisomicina y puromicina (Sigma), dehidroemetina (Roche), clorhidrato de naloxona (Endo) y clorhidrato de morfina (Merck). Todas las sustancias fueron disueltas en solución salina, excepto la cicloheximida y el cloranfenicol que fueron suspendidas en carboximetilcelulosa al 0.2%. Todas las dosis se expresan en términos de la sal.

III. DISCUSION

Desde los estudios iniciales con los dos pentapéptidos descubiertos por Hughes (66) se encontró que sus efectos analgésicos son de muy corta duración (Belluzi y cols, 1976), hecho que señaló la posibilidad de una rápida biodegradación orgánica. Pronto se observó que las encefalinas son rápidamente hidrolizadas en sus aminoácidos constituyentes cuando se les ponía en contacto con el tejido cerebral, ya sea por inyección local o *in vitro* con extractos cerebrales (Barclay y Phillips, 1978; Vogel y Altstein, 1979). Las aminopeptidasas fueron las primeras enzimas hidrolizantes de encefalinas en ser identificadas, su acción libera cantidades importantes de tirosina. Estas enzimas parecen ser metaloenzimas y son altamente sensibles al efecto inhibitor de la bestatina, un producto de origen bacteriano (Barclay y Phillips, 1980). La puromicina, antibiótico que inhibe la síntesis proteica y la bacitracina también inhiben las aminopeptidasas hidrolizantes de encefalinas (Knight y Klee, 1978; Malfroy y cols, 1979; Hudgin y cols, 1981; Hui y cols, 1981), aún cuando, en general, son menos potentes que la bestatina.

El segundo sistema enzimático biodegradante está constituido por las dipeptidilcarboxipeptidasas o encefalinasas, detectado inicialmente en las membranas celulares (100). Las encefalinasas actúan sobre la unión Gli-Fen o Gli-Gli y se le localiza en diversas partes del SNC y en una gran variedad de tejidos periféricos. Estas enzimas son inhibidas débilmente por el captopril (Erdos y cols, 1978) y en forma muy significativa por el tiorfan (Roques y cols, 1980).

Un tercer sistema enzimático descansa en la acción de la enzima convertidora de angiotensina, que cataliza la formación del octapéptido angiotensina II a partir del decapeptido angiotensina I. Se encontró que esta enzima (peptidildipeptidasa) hidroliza las encefalinas al nivel de la unión Gln-Fen (40); esta acción es claramente inhibida por compuestos como el captopril.

Ehrenpreis y cols fueron los primeros en reportar que los inhibidores de la biodegradación de las encefalinas producen analgesia (36). Este grupo demostró que la administración de dosis elevadas de D-fenilalanina, bacitracina, puromicina, bestatina y captopril produce analgesia en el ratón, la cual se caracteriza por una instalación lenta y que alcanza su máximo en aproximadamente 2 días (37). Este efecto guarda cierta relación con la acumulación cerebral de encefalinas y es revertido por la acción de la naloxona. El tiorfan también tiene propiedades antinociceptivas y es antagonizado por la naloxona (Roques y cols, 1980). En un estudio muy bien diseñado, Herman y cols (61) demostraron que la administración intracerebroventricular de puromicina, en dosis de 100-400 mcg, produce analgesia dosis-dependiente en ratones, paralela a un incremento en la concentración de encefalinas en el cuerpo estriado, que es abolida por la naloxona. También encontraron que la bacitracina (10-50 mcg, ICV) produce analgesia dosis-dependiente y aumenta la concentración estratial de encefalinas; sin embargo, el efecto de la bacitracina no fue antagonizado por la naloxona. Por ello concluyeron que el efecto de este antibiótico es inespecífico.

Los resultados de los estudios que aquí se reportan señalan que la cicloheximida y la bacitracina, administradas por vía parenteral, producen algunos efectos conductuales de tipo opiáceo. Se pudo demostrar que la cicloheximida produce un incremento dosis-dependiente de la actividad locomotora del ratón. El efecto fue aparente con dosis de 37.5 mg/kg y máximo con 300 mg/kg. La hiperactividad provocada por la cicloheximida fue evitada con la administración previa de naloxona (10 mg/kg). Cabe subrayar que las dosis requeridas de cicloheximida son considerablemente más altas que las de morfina; asimismo, que el efecto máximo producido por la morfina es claramente mayor que el inducido por la cicloheximida.

La cicloheximida, al igual que la morfina, mostró propiedades antinociceptivas en los tres modelos experimentales. En el caso de la morfina el efecto máximo se observó a los 15 min y con las dosis intermedias y altas (3.1 y 10 mg/kg) produjo analgesia en todos los animales probados. Su efecto antinociceptivo de la cicloheximida se instaló lentamente y fue máximo a los 60 min. Aún con las dosis más altas no se logró el efecto en todos los animales probados. El análisis cuantitativo reveló que la cicloheximida es de 63 a 450 veces menos potente que la morfina. La naloxona fue capaz de prevenir tanto los efectos antinociceptivos de la morfina como de la cicloheximida.

El patrón de efectos producido por la bacitracina fue diferente. Disminuyó significativamente la actividad locomotora, efecto que no fue prevenido por la naloxona, y solo fue activa en los modelos de la pinza arterial y del estiramiento corporal

producido por la acetilcolina; su actividad antinociceptiva fue menor que la observada con cicloheximida y fue antagonizada por la naloxona.

Estos hallazgos sugieren que el efecto analgésico de la cicloheximida y de la bacitracina, el cual se instala de manera gradual, puede deberse a su capacidad de interactuar con los sistemas encefalinérgicos. Se ha reportado que la bacitracina inhibe la actividad de las aminopeptidasas cerebrales (Hudgin y cols, 1981); asimismo, que produce analgesia en ratones (Simmons y Ritzman, 1980) y en ratas (Patthy y cols, 1977) cuando se administra por vía intracerebroventricular (ICV), efecto que es revertido por la naloxona (Patthy y cols, 1977). Sin embargo, no produce analgesia (Pinsky y cols, 1980) o produce hiperanalgesia (Girault y cols, 1980) cuando se deposita en otras regiones del SNC. En 1982, Sikand y Havlíček demostraron que la bacitracina (52 mcg) por vía ICV aumenta un 27% las concentraciones cerebrales de beta-endorfina en la rata e induce analgesia de corta duración, efecto que fue totalmente bloqueado por la naloxona (1 mg/kg) (143). Los estudios de Herman y cols (1985) confirmaron que la bacitracina, por vía ICV, produce analgesia dosis-dependiente y aumenta la concentración estriatal de encefalinas; sin embargo, tal efecto no es antagonizado por naloxona. En este trabajo se observó que el efecto analgésico de la bacitracina es relativamente débil. Con base a los resultados descritos, se puede pensar que en el efecto analgésico de la bacitracina participa el sistema encefalinérgico, ya que la analgesia es antagonizada por la naloxona y otros autores han demostrado que el antibiótico aumenta los niveles de encefalinas.

Sin embargo, tal mecanismo no parece ser específico, ya que sólo se presenta con dosis que producen efectos neurotóxicos severos y el antagonismo por la naloxona no es consistente.

El patrón de efectos producido por la cicloheximida es típico de los fármacos que inhiben las enzimas biodegradantes. Se sabe que este antibiótico inhibe la formación de las cadenas peptídicas en las bacterias por acción sobre la peptidil transferasa. La revisión de la literatura no nos permitió identificar reportes acerca de los efectos de este antibiótico sobre las enzimas responsables de la biodegradación de los péptidos opiáceos. Por ello, es probable que los resultados de este estudio constituyan una contribución en este campo. Los efectos producidos por la cicloheximida pueden tener otra explicación: una acción directa sobre los receptores opiáceos, la cual es menos probable, dada la relativa lentitud, en que se instala el efecto analgésico. Ninguna de estos dos posibles explicaciones sobre el mecanismo por el cual la cicloheximida produce efectos de tipo opiáceo puede precisarse con base en las investigaciones que aquí se reportan.

Es importante destacar la ausencia de efectos locomotores y antinociceptivos de los otros antibióticos, capaces de inhibir la síntesis proteica, incluidos en este estudio. La anisomicina, que impide la reacción de transferencia del aminoacil-tRNA a los ribosomas (Grollman, 1967); el cloramfenicol, que se une específicamente a la unidad ribosomal 50S e impide la transferencia de aminoácidos y, por ende, el crecimiento de las cadenas peptídicas, probablemente por acción directa sobre la peptidil transferasa (Pestka, 1971); la dehidroemetina, que bloquea en

forma irreversible la síntesis proteica al inhibir el desplazamiento del ribosoma a los largo del DNA mensajero; y la puromicina, que inhibe la arilamidasa cerebral (Marks y cols, 1968). Por otro lado, ya se había que mencionado que *in vitro* la degradación de encefalinas es inhibida eficazmente por la puromicina (Barclay y col, 1980) y la bacitracina (Miller y cols, 1977), al inhibir la actividad de las aminopeptidasas (Herman, 1985). Cuando se administran por vía ICV ambas sustancias también impiden la biodegradación de las encefalinas, cuya acumulación produce efectos opiáceos, especialmente analgesia (Herman, 1985). En el presente trabajo ambos fármacos se administraron por vía intraperitoneal y la ausencia de efectos con la puromicina puede explicarse por la dificultad de este fármaco para atravesar la barrera hematoencefálica. De hecho, Ehrenpreis logró demostrar efectos analgésicos con la administración sistémica de puromicina utilizando ratones muy jóvenes (2 a 3 semanas), cuya barrera no está totalmente desarrollada (37).

Estos datos parecen indicar que la capacidad de inhibir las endopeptidasas y las encefalinasas es independiente de las acciones relativas a la inhibición de la síntesis proteica, como ya han sugerido otros autores (Vogel y Altstein, 1979). En favor de esta posibilidad también está el hecho de que la cicloheximida y la puromicina impiden la síntesis proteica, la primera por bloquear la elongación de la cadena peptídica e inmovilizar a los polisomas y la segunda, análogo del aminoacil RNA-t, separa la cadena en desarrollo del complejo peptidil-RNA-t-mensajero-ribosoma, formándose peptidil puromicina;

mientras que la bacitracina inhibe la síntesis del peptidoglicano por la inhibición de la desfosforilación del lípidio-pirofosfato, además forma un complejo con el ión magnesio y el pirofosfato C_{65} -isoprenil, complejo responsable de la inhibición de la síntesis de la pared celular (Pratt). Otro dato que apoya esta hipótesis de la acción opioide de la bacitracina y de la cicloheximida por un mecanismo de acción diferente a la inhibición de la síntesis de pared celular o de la síntesis proteica, respectivamente, es la modificación de la toxicidad aguda por la administración previa de naloxona, al igual que ocurre con la morfina.

ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA PAGINA

IV. CONCLUSIONES

1. La cicloheximida, al igual que la morfina, produce un incremento dosis-dependiente de la actividad locomotora del ratón e inhibe, también en forma dosis-dependiente, la respuesta conductual a tres tipos distintos de estímulos nociceptivos. En todos los casos, los efectos se instalaron de manera gradual y su potencia relativa es claramente inferior a la observada con el opiáceo.

2. El pretratamiento con naloxona, un antagonista de narcóticos, evita la hiperactividad, la analgesia y la letalidad producidas por la cicloheximida y la morfina.

3. Estos resultados revelan que la cicloheximida produce en el ratón efectos de tipo opiáceo, los cuales parecen consecuencia de una inhibición de las enzimas biodegradantes de las encefalinas. Sin embargo, no se ha reportado esta acción para la cicloheximida y los estudios que aquí se reportan no exploraron esta posibilidad.

4. El patrón de efectos de la bacitracina es diferente. Disminuye la actividad locomotora del ratón y su actividad analgésica es muy discreta. Ambos efectos parecen estar relacionados con el sistema encefalinérgico, ya que se ha reportado que este antibiótico aumenta los niveles cerebrales de encefalinas. Sin embargo, sus efectos no son consistentemente antagonizados por la naloxona y solo se presentan con dosis neurotóxicas.

IV. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, J.E.: Naloxone reversal of analgesia produced by brain stimulation in the human. *Pain* 2: 161-166, 1976.
2. Akil, H., Mayer, D.J. and Liebeskind, J.C.: Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science* 191:961-962, 1976.
3. Akil, H., Richardson, D.E., Barchas, J.D. and Li, C.H.: Appearance of beta-endorphin-like immunoreactivity in human ventricular cerebrospinal fluid upon analgesic electrical stimulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75:5170-5172, 1978.
4. Almenoff, L., Wilk, S. and Orlowski, M.: Membrane bound pituitary metalloendopeptidase. Apparent identity to enkephalinase. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 102:206-214, 1981.
5. Appelbaum, B.D. and Holtzman, S. G.: Restraint stress enhances morphine-induced analgesia in the rat without changing apparent affinity of receptor. *Life Sci.* 36: 1069-1074, 1985.
6. Barclay, R.K. and Phillips, M.A.: Inhibition of the enzymatic degradation of leu-enkephalin by puromycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81:1119-1123, 1978.
7. Barclay, R.K. and Phillips, M.A.: Inhibition of enkephaline-degrading aminopeptidase activity by certain peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1732-1738, 1980.
8. Bayon, A., Rossier, J., Mauss, A., Bloom, F., Iversen, L., Ling, N. and Guillemin, R.: In vitro release of (5 methionine) enkephaline and (5-leucine)-enkephaline from rat *globus pallidus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75:3503-3506, 1978.
9. Bayon, A., Koda, L., Batternberg, E. and Bloom, F.: Redistribution of endorphin and enkephalin immunoreactivity in the rat brain and pituitary after in vivo treatment with colchicine or cytochalasin 3. *Brain Res.* 183:103-111, 1980.
10. Bayon, A. y Sordo, 1983.
11. Becket, A.H. and Casey, A.F.: Analgesics and their antagonists: Biochemical aspects and structure-activity relationships. *Prog. Med. Chem.* 4:171-218, 1965.
12. Belluzzi, J.D., Grant, N., Gareky, V., Sarantakis, D., Wise, C.D. and Stein, L.: Analgesia induced in vivo by central administration of enkephalin in rat. *Nature* 260:625-626, 1976.

13. Benuck, M. and Marks, N.: Characterization of a distinct membrane bound dipeptidyl carboxypeptidase inactivating enkephalin in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85:822-828, 1980.
14. Bianchi, C. and Franceschini, J.: Experimental observations on Haffner's method for testing analgesic drugs. *Br. J., Pharmacol and Chemother.* 9:280-284, 1954.
15. Bloom, F., Segal, D., Ling, N. and Guillemin, R.: Endorphins: profound behavioral effects in rats suggests new etiological factors in mental illness. *Science* 194:630-632, 1976.
16. Bloom, F.E. The endorphins: A growing family of pharmacologically pertinent peptides. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23:151-170, 1983.
17. Bodnar, R.J., Williams, C., Lee, S. et al: Morphine analgesia in the periaqueductal gray and locus coeruleus: Involvement of μ_1 receptors. *Neurology* 37 (1):187, 1987.
18. Bradbury, A.F., Smyth, D.G. and Snell, C.R.: Lipotropin precursor to two biologically active peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69:950-956, 1976.
19. Buscher, H.H., Hill, R.C., Romer, D., Cardinaux, A., Closse, A., Hauser, D. and Pless, J.: Evidence for analgesic activity of enkephalin in the mouse. *Nature* 261:423-425, 1976.
20. Carenzi, A., Morpurgo, E. and Della Bella, D.: Strong analgesic activity of leu-enkephalin after inhibition of brain aminopeptidase: Pharmacological and biochemical studies. In: *Advances in Endogenous and Exogenous Opioids* (eds. H. Tagaki and E.J. Simon), Tokio: Kodansha-Elsevier, 1981. pp. 275-280
21. Chang, J.K., Fong, B.T.W., Pert, A. and Pert, C.B.: Opiate receptor affinities and behavioral effects of enkephalin. Structural/activity relationship for ten synthetic peptide analogues. *Life Sci.* 18:1473-1481, 1976.
22. Chang, K.J. and Cuatrecasas, P.: Multiple opiate receptors: Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. *J. Biol. Chem.* 254:2610-2618, 1979.
23. Chavkin, C., James, I.F. and Goldstein, A.: Dynorphin is a specific endogenous ligand of the K opioid receptor. *Science* 215:413, 1982.
24. Chretien, M., Benjannet, S., Dragon, N., Seidah, N.G. and Lis, M.: Isolation of peptides with opiate activity from sheep and human pituitaries: Relation to beta-lipotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72:472-478, 1976.

25. Collier, H.O.J., Dinneen, L. C., Johnson, Ch. and Schneider, C.: The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 32:295-310, 1968.
26. Comb, M., Seeburg, P.H., Adelman, J., Eiden, L. and Herbert, E.: Primary structure of the human met- and leu-enkephaline precursor and its mRNA. *Nature.* 295:663-666, 1982.
27. Cone, R.I., Weber, E., Barchas, J.D. and Goldstein, A.: Regional distribution of dynorphin and neoeendorphin peptides in rat brain, spinal cord and pituitary. *J. Neurosci.* 3:2146-2152, 1983.
28. Corrigan, W.A., Linseman, M.A., D'Onofrio, R. and Lei, H.: An analgesic of the paradoxical effect of morphine on runway speed and food consumption. *Psychopharmacology* 89:327-333, 1986.
29. Craven, F.B., Law, P.Y., Hunt, C.A. and Loh, H.H.: The metabolic disposition of radiolabelled enkephalins in vitro and in situ. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206:492-506, 1978.
30. Creese, I. and Snyder, S.H.: Receptor binding and pharmacological activity of opiates in the guinea-pig intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 194:205-219, 1975.
31. Crine, P., Gossard, F., Seidah, N.G. et al: Concomitant synthesis of beta-endorphin and alpha-melanotropin from two forms of pro-opiomelanocortin in the rats pars intermedia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1976: 5085-5090, 1979.
32. De la Baume A, Yi C.C., Schwartz, J.C., Chaillet, P., Marcqis-Collado, H. and Constantin, J.: Participation of both enkephalinase and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. *Neurosci.* 8:143-151, 1983.
33. Della Bella, D., Carezzi, D.A., Frigeni, V. and Santini, V.: Effect of carboxypeptidase inhibition on the in vivo and in vitro pharmacological properties of morphine and enkephalins. *Neuropharmacol.* 18:719-721, 1979.
34. DiPalma, J.R.: *Drill/Farmacología Médica (2a ed.)*. La Prensa Médica Mexicana, México, D.F., 1978
35. Egan, T.M. and North, R.A.: Both mu and delta opiate receptors exist on the same neuron. *Science* 214:923-924, 1981.
36. Ehrenpreis, A., Balagot, R.C., Comaty, J.E. and Myles, S.B.: Naloxone reversible analgesia in mice produced by D-phenylalanine and hidrocinnamic acid, inhibitors of carboxypeptidase A. *Adv. in Pain Res. and Ther.* 3:479-487, 1979.

37. Ehrenpreis, S.: Analgesic properties of enkephalinase inhibitors. *Animal and human studies Endopoids*. 363-370, 1985.
38. Ehrlich, P.: *Chemotherapeutics: scientific principles, methods and results*. *Lancet* 2: 445, 1913.
39. Elde, R., Hokfelt, T., Johansson, O. and Terenius, L.: Immunohistochemical studies using antibodies to leucine-enkephalin: Initial observations on the nervous system of the rat. *Neuroscience*. 1:349-351, 1976.
40. Erdos, E.G., Johnson, A.L. and Boyden, N.T.: *Biochem. Pharmacol.* 27:843-848, 1978.
41. Ford, R., Jackson, D.M., Tetrault, L., Torres, J.C., Assanah, P., Harper, J., Leung, M.K. and Stefano, G.B.: A behavioral role of enkephalins in regulating locomotor activity in the insect *Leucophaea maderae*: Evidence for high affinity kappa-like opioid binding sites. *Comp. Biochem. Physiol.* 85:61-65, 1986.
42. Friederich, M. W., Friederich, D.P. and Walker, J.M.: Effects of dynorphin (1-8) on movement: Non-opiate effects and Structure-activity relationship. *Peptides* 8:837-840, 1987.
43. Frigeri, V., Bruno, F., Carezzi, A., Racagni, G. and Santini, V.J.: Analgesia and motor activity elicited by morphine and enkephalins in two inbred strains of mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 30:310-311, 1978.
44. Gainer, H., Russell, J.T. and Loh, Y.P.: *Neuroendocrinology*. 40:171-184, 1985.
45. Galina, Z.H. and Amit, Z: Interactions between ACTH, morphine, and naloxone and their effects on locomotor behavior. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 9:691-695, 1985.
46. Gallagher, M., Rapp, P.R. and Fanelli, R.J.: Opiate antagonist facilitation of time-dependent memory processes: Dependence upon intact norepinephrine functions. *Brain Res.* 347:284-290, 1985.
47. Gilbert, P.E. and Martin, W.R.: The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the non-dependent, morphine-dependent, and cyclazocine-dependent spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 198:66-82, 1976.
48. Gintzler, A.R. and Fasternak, G.W.: Multiple mu Receptors: evidence for μ_2 sites in the guinea pig ileum. *Neurosci. Lett.* 39:51-56, 1983.

49. Girault, J.M., Suaudeau, Ch. and Jacob, J.: Effects comportementaux d'administration intracérébrale locale d'un antagoniste de la morphine (Mr 2266) et d'un inhibiteur potentiel du métabolisme des enképhalines (bacitracine). *J. Pharmacol (Paris)* 11:81-82, 1980.
50. Goldstein, A., Lowney, L.I. and Pal, B.K.: Stereospecific and non-specific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:1742-1747, 1971.
51. Goldstein, A., Aronow, L. and Kalman, S.M.: Principles of drug action. The basis of pharmacology. John Wiley and Sons, 2d. edition. New York, London, Sydney and Toronto, 1974. pp. 1-127.
52. Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M. and Hood, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 76:6666-6670, 1979.
53. Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L.I., Hunkapiller, M. and Hood, L.: Porcine pituitary dynorphin: Complete amino acid sequence of the biologically active heptapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78:7219-7223, 1981.
54. Goodman, R.R., Snyder, S.H., Kuhar, M.J. and Young, W.S.: Differentiation of delta and mu opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 77:6239-6243, 1980.
55. Gorenstein, C. and Snyder, S.H.: Two distinct enkephalinases: solubilization, partial purification and separation from angiotensin converting enzyme. *Life Sci*. 25:2065-2070, 1979.
56. Grollman, A. P.: Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin. *J. Biol. Chem.* 242:3226-3233, 1967.
57. Haffner, D.: Experimentelle prüfung schmerzstillender mittel. *Dtsch. med. Wschr* 55:731-733, 1929.
58. Hambrook, J.M., Morgan, B.A., Rance, M.J. and Smith, C.F.: Mode of deactivation of the enkephalines by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature*. 262:782-783, 1976.
59. Havemann, U. and Kuschinsky, K.: Locomotor activity of rats after injection of various opioids into the nucleus accumbens and the septum mediale. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 331:175-180, 1985.
60. Henderson, G., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W.: In vitro release of Leu- and met-enkephalin from the corpus striatum. *Nature* 271:677-679, 1978.
61. Herman, Z.S., Stachura, Z., Laskawiec, G., Kowalski, J. and Obuchowicz, E.: Antinociceptive effects of puromycin and bacitracin. *FoL. J. Pharmacol. Pharm.* 37:133-141, 1985.

62. Hersh, L.B.: Degradation of enkephalins: The search for an enkephalinase. *Mol. Cell. Biochem.* 4:35-43, 1982.
63. Hollt, V.: Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* 26:59-77, 1986.
64. Holtzman, S.G.: Phencyclidine-like discriminative stimulus properties of opioids in the squirrel monkey. *Psychopharmacology* 77:295-300, 1982.
65. Hudgin, R.L., Charleson, S.E., Zimmerman, M., Mumford, R. and Wood, P.L.: Enkephalinase: selective peptide inhibitors. *Life Sci.* 29:2593-2601, 1981.
66. Hughes, J.: Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88:295-308, 1975a.
67. Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. and Morris, H.R.: Identification of two related peptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature.* 258:577-579, 1975b.
68. Hui, K.S., Wang, Y.J., Tsai, H., Wong, K.H. and Lajtha, A.: The effect of naloxone on enkephalin catabolism. *Peptides (suppl. 1):*81-94, 1981.
69. Hutchinson, M., Kosterlitz, H.W., Leslie, F.M., Waterfield, A.A. and Terenius, L.: Assessment in the guinea-pig ileum and mouse vas deferens of benzomorphans which have strong antinociceptive activity but do not substitute for morphine in the dependent monkey. *Br. J. Pharmacol.* 55:541-546, 1975.
70. Itho, S. and Katsuura, G.: Frontocortical regulation of beta-endorphin actions in the rat. *Peptides* 6:237-240, 1985.
71. Iversen, L.L., Iversen, S.O., Bloom, F.E., Vargo, T. and Guillemin, R.: Release of enkephalin from rat globus pallidus in vitro. *Nature.* 271:679-681, 1978.
72. Jacquet, Y. F. and Marks, N.: The C-fragment of beta-lipotropin: an endogenous neuroleptic or antipsychotogen? *Science* 194:632-635, 1976.
73. Jhamandas, K.H.: Opioid-neurotransmitter interactions: Significance in analgesia, tolerance and dependence. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 8: 565-570, 1985.
74. Johnson, N., Houghten, R. and Pasternak, G.W.: Binding of 3 H- β -Endorphin in rat brain. *Life Sci.* 31:1381-1384, 1982.
75. Kalivas, P.W.: Sensitization to repeated enkephalin administration into the ventral tegmental area of the rat. II. Involvement of the mesolimbic dopamine system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235:544-550, 1985.

76. Kalivas, P.W. and Bronson, M.: Mesolimbic dopamine lesions produce an augmented behavioral response to enkephalin. *Neuropharmacology* 24:931-936, 1985.
77. Kameyama, T., Nabeshima, T. and Yamada, K.: Differences of alteration in opioid systems induced by conditioned suppression and electric footshock in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22:249-254, 1985.
78. Kavaliers, M. and Ines, D.G.L.: Sex and day-night differences in opiate-induced responses of insular wild deer mice, *Peromyscus maniculatus triangularis*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 27:477-482, 1987.
79. Khachaturian, H., Lewis, M.E. and Schafer, M.K.H.: Anatomy of the CNS opioid systems. *Trends Neurosci.* 8:111-119, 1985a.
80. Khachaturian, H., Lewis, M.E. and Tsou, K.: Beta endorphin, alfa-MSH, ACTH, and related peptides. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy* A. Bjorklund and T. Horkfelt (eds). New York, Elsevier, 1985b. pp 216-272.
81. Knight, M. and Klee, W.A.: The relationship between enkephalin degradation and opiate receptor occupancy. *J. Bio. Chem.* 253:3843-3847, 1978.
82. Kobayashi, R., Falkovitz, M., Miller, R.J., Chang, K. J. and Cuatrecasas, P.: Brain enkephalin distribution is unaltered by hypophysectomy. *Life Sci.* 22:527-530, 1978.
83. Kuhar, M.J., Pert, C.B. and Snyder, S.: Regional distribution of opiate receptors binding in monkey and human brain. *Nature.* 245:447-450, 1973.
84. Langley, J.N.: On nerve ending and on spinal excitable substances in cells. *Proc. Roy. Soc.* B78:170, 1906.
85. Leslie, F.M., Chavkin, C. and Cox, B.M.: Opioid binding properties of brain and peripheral tissues: Evidence for heterogeneity in opioid ligand binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214:395-402, 1980.
86. Lewis, R.V. and Stern, A.S.: Biosynthesis of the enkephalins and enkephalin-containing peptides. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23:353-372, 1983.
87. Li, C.H.: Lipotropin: a new active peptide from pituitary glands. *Nature* 201:924-926, 1964.
88. Li, C.H., Chung, D. and Doneen, B.A.: Isolation, characterization and opiate activity of beta-endorphin from human pituitary glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72:1542-1547, 1976.
89. Li, C.H. and Chung, D.: Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:1145-1148, 1976.

90. Ling, G.S.F. and Pasternak, G.W.: Spinal and supraspinal analgesia in the mouse: The role of subpopulations of opioid binding sites. *Brain Res.* 271:152-156, 1983.
91. Ling, G.S.F., Spiegel, K., Lockhart, S.H. and Pasternak, G.W.: Separation of opioid analgesia from respirator depression: Evidence for different receptor mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232:149-155, 1985.
92. Liston, D.R., Vanderhaeghen, J.J. and Rossier, J.: Presence in brain of synenkephalin, a proenkephalin-immuno-reactive protein which does not contain enkephalin. *Nature.* 302:62-65, 1983.
93. Liston, D., Patey, G., Rossier, J., Verbanck, P. and Vanderhaeghen, J.J.: Processing of proenkephalin is tissue-specific. *Science* 225:734-737, 1984.
94. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F.: A simplified method for evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96:99-113, 1949.
95. Loh, H.H., Cho, T.M., Wu, Y.C., Harris, R.A. and Way, L.: Opiate binding to cerebroside sulfate: A model system for opiate receptor interaction. *Life Sci.* 16:1811-1818, 1975.
96. Loh, H.H., Tseng, L.F., Wei, E. and Li, C.H.: Beta-endorphin is a potent analgesic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:2895-2898, 1976.
97. Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W.: Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267:495-499, 1977.
98. Mains, R.E., Eipper, B.A. and Ling, N.: Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:3014-3018, 1977.
99. Malfroy, B., Swerts, J.F., Guyon, A., Roques, B.P. and Schwartz, J.C.: High-affinity enkephalin-degrading peptidase in mouse brain and its enhanced activity following morphine. *Nature.* 276:523-526, 1978.
100. Malfroy, B., Swertz, J.F., Liourens, C. and Schwartz, J.C.: Regional distribution of high enkephalin-degrading peptidase (enkephalinase) and effect of lesions suggest localization in the vicinity of opiate receptor in brain. *Neurosc. Letters.* 11:329-334, 1979.
101. Marks, N., Datta, R.K. and Lajtha, A.: Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* 243:2882-2889, 1968.
102. Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E. and Gilbert, P.E.: The effects of morphine and morphine-like drugs in the non-dependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197:512-523, 1976.

103. Meek, J., Yang, H.Y. and Costa, E.: Enkephalin catabolism in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* 16:151-154, 1977.
104. Miller, R.J., Chang, K.J., Cuatrecasas, P. and Wilkinson, S.: The metabolic stability of the enkephalins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74:1311-1318, 1977.
105. Minamino, N., Kangawa, K., Chino, N., Sakakibara, S. and Matsuo, H.: Beta-neoendorphin, a new hypothalamic big leu-enkephalin of porcine origin: Its purification and the complete amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99:864-870, 1981.
106. Moskowitz, A.S. and Goodman, R.R.: Autoradiographic distribution of μ_1 and μ_2 opioid binding in the mouse central nervous system. *Brain Res.* 360:108-116, 1985.
107. Nakao, K., Suda, M., Sakamoto, M., Yoshimasa, T., Morii, N. et al: Leuomorphin is a novel endogenous opioid derived from preproenkephalin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117:695-701, 1983.
108. Nistico, G., Bageta, G. and De Sarro, G.D.: Behavioral and spectrum power effect of opioid peptides in chicks. *Peptides* 6 (3):137-141, 1985.
109. Oka, T., Negishi, K., Suda, M., Matsumiya, T., Inazu, T. and Ueki, M.: Rabbit vas deferens: A specific bioassay for opioid kappa receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.* 73:235-236, 1981.
110. Olson, G.A., Olson, R.D. and Kastin, A.J.: Endogenous opiates: 1987. *Peptides* 10:205-236, 1989.
111. Pasternak, G.W. and Snyder, S.H.: Opiate receptor binding: Effects of enzymatic treatment. *Mol. Pharmacol.* 10:183-193, 1973a.
112. Pasternak, G.W., Childer, S.R. and Snyder, S.H.: Naloxasone, a long-acting opiate antagonist: Effects in intact animals and on opiate receptor binding in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214:455-462, 1980.
113. Pasternak, G.W. and Woods, P.L.: Multiple μ receptors. *Life Sci.* 38:1889-1898, 1986.
114. Pasternak, G.W.: Multiple μ opiate receptors: Biochemical and pharmacological evidence for multiplicity. *Biochem. Pharmacol.* 35:301-364, 1986.
115. Pasternak, G.W.: Opioid receptors. *Psychopharmacology. The Third Generation of Progress.* Meltzer, H.Y. (ed.), Raven Press, New York. 1987 pp. 281-280.

116. Patey, G., De la Baume, S., Schwartz, J.C., Gross, C., Roques, B.P., Fournie-Zaluski, M.C. and Soroca-Lucas, E.: Selective protection of methionine-enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition. *Science*. 212:1153-1155, 1981.
117. Patthy, A., Graf, L., Kenessey, A., Székely, J.I. and Bajusz, S.: Effect of bacitracin on the biodegradation of beta-endorphin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79:254-259, 1977.
118. Pelletier, G., Leclerc, R., Saavedra, J.M., et al. Distribution of beta-lipotropin (beta-LPH), adrenocorticotropin (ACTH) and alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) in the rat brain. I. Origin of the extrahypothalamic fibers. *Brain Res.* 192:433-440, 1980.
119. Pert, C.B. and Snyder, S.H.: Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science*. 179:1011-1014, 1973a.
120. Pert, C.B. and Snyder, S.H.: Properties of opiate receptor binding in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:2243-2247, 1973b.
121. Pert, C.B., Snowman, A.M. and Snyder, S.H.: Localization of opiate receptor binding in synaptic membranes of rat brain. *Brain Res.* 70:184-188, 1974.
122. Pestka, S.: Inhibitors of ribosome functions. *Ann. Rev. Microbiol.* 25:487-562, 1971.
123. Pinsky, C., Dua, A.K., Brockhausen, E., Havlicek, V. and Labella, F.S.: Endorphin-like responses provoked by intracerebroventricular peptidase inhibitors in mildly stressed rats. In: *Endogenous and Exogenous Opiate Agonists and Antagonists*. Ed. L. Way, Pergamon Press, New York, 1980. pp. 467-470.
124. Pomeranz, B. and Chiu, D.: Naloxone blockade of acupuncture analgesia: Endorphin implicated. *Life Sci.* 19:1757-1762, 1976.
125. Pratt, W.B.: *Quimioterapia de la infección*. Fondo Educativo Interamericano, S.A., 1981.
126. Quirion, R., Zajac, J.M., Morgat, J.L., et al: Autoradiographic distribution of mu and delta opiate receptors in rat brain using highly selective ligands. *Life Sci.* 33 (1): 227-230, 1983.
127. Ramabadran, K. and Jacob, J.J.C.: Stereospecific effects of opiate antagonists on superficial and deep nociception and on motor activity suggest involvement of endorphins on different opioid receptors. *Life Sci.* 24:1959-1970, 1979.

128. Rethy, C.R., Smith, C.B. and Villarreal, J.E.: Effects of narcotic analgesics upon the locomotor activity and brain catecholamine content of the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176:472-479, 1971.
129. Reynolds, D.V.: Surgery in the rat during electrical analgesic induced by focal brain stimulation. *Science.* 164:444-445, 1969.
130. Romer, D., Buescher, H.H., Hill, R.C., Pless, J., Bauer, W., Cardinaux, F., Closse, A., Hauser, D. and Huguenin, R.: FK-33824, a synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity. *Nature* 268:547-549, 1977.
131. Roques, B.P., Fournie-Zalusky, M.C., Soroca, E., Lecomte, T.M., Malfroy, B., Llorens, C. and Schwartz, T.C.: The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature.* 288:286-288, 1980.
132. Rossier, J., Trifaro, M.M., Lewis, R.V., Lee, R.W.H., Stern, A., Kumura, S., Stein, S. and Udenfriend, S.: Studies with (\pm S) methionine indicates the 22000-dalton met-enkephalin-containing protein in chromaffin cells is a precursor of met-enkephalin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:6889-6891, 1980.
133. Rubenstein, M., Stein, S. and Udenfriend, S.: Characterization of proopiocortin, a precursor to opioid peptides and corticotropin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75:669-671, 1978.
134. Schnebli, H.P., Phillips, M.A. and Barclay, R.R.: Isolation and characterization of an enkephalin degrading aminopeptidase from rat brain. *Bioch. Biophys. Acta.* 269:89-98, 1979.
135. Schnur, P.: Effects of naloxone and naltrexone on morphine elicited changes in hamster locomotor activity. *Physiol. Psychol.* 13:26-32, 1985.
136. Schultz, R., Faase, E., Wuster, M. and Herz, A.: Selective receptors for beta-endorphin on the rat vas deferens. *Life Sci.* 24:843-850, 1979.
137. Schultz, R., Wuster, M. and Herz, A.: Pharmacological characterization of the epsilon-opiate receptor *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216:604-606, 1981.
138. Schuster, L., Hannam, R.V. and Boyle, W.E.: A simple method for producing tolerance to dihydromorphinone in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 140:149-153, 1963.
139. Schwartz, J.C., Malfroy, B. and De la Baume, S.: Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin dipeptidyl carboxypeptidase (enkephalinase). *Life Sci.* 29:1715-1740, 1981.

140. Schwartzberg, D.G. and Nakane, P.K. ACTH-related peptide containing neurons within the medulla oblongata of the rat. *Brain Res.* 273:351-356, 1983.
141. Shannon, H.E.: Pharmacological evaluation of N-Allylnormetazocina (SKF10,047) on the basis of its discriminative stimulus properties in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225:144-152, 1983.
142. Sherman, G.T. and Herz, A.: Discriminative stimulus properties of bremazocine in the rat. *Neuropharmacology* 20:1209-1213, 1981.
143. Sikand, G. and Havlicek, V.: Bacitracin produces analgesia by increasing brain immunoreactive beta-endorphin content. *Brain Res.* 242:119-123, 1982.
144. Simantov, R. and Snyder, S.H.: Morphine like peptides in mammalian brain: Isolation, structure elucidation an interactions with opiate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:2515-2519, 1976.
145. Simmons, W.H. and Ritzman, R.F.: An inhibitor of opioid peptide degradation produces analgesia in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13:715-718, 1980.
146. Simon, E.J., Hiller, J.M. and Edelman, I.: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic H-etorphine to rat brain homogenates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:1947-1949, 1973.
147. Sjolund, B. and Eriksson, M.: Electroacupuncture and endogenous morphines. *Lancet* 2:1085, 1976.
148. Smythies, R.J.: Possible molecular forms of opiate receptor. *Life Sci.* 16:1819-1820, 1975.
149. Snyder, S.: Opiate receptors and internal opiates. *Sci. Am.* 236:44-56, 1977.
150. Stahl, K.D., van Bever, W., Janssen, P. and Simon, E.J.: Receptor affinity and pharmacological potency of a series of narcotic analgesic, antidiarrheal and neuroleptic drugs. *Eur. J. Pharmacol* 46:199-205, 1977.
151. Stine, S.M., Yang, H.Y.T. and Costa, E.: Inhibition of in situ metabolism of met-enkephalin and potentiation of met-enkephalin analgesia by captopril. *Brain Res.* 188:295-299, 1981.
152. Sullivan, S., Akil, H. and Barchas, J.D.: In vitro degradation of enkephalin: evidence for cleavage at the Gly-Phe bond. *Commun. Psychopharmacol.* 2:525-531, 1978.
153. Terenius, L.: Characteristics of the receptor for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fractions from rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 32:377-384, 1973.

154. Terenius, L. and Wahlstrom, A.: Inhibitor (s) of narcotic receptor binding in brain extracts and in cerebrospinal fluids. *Acta Pharm. Toxicol.* 33 (1):55-58, 1974.
155. Terenius, L.: Somatostatin and ACTH are peptides with partial antagonist like selectivity for opiate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 38:211-213, 1976.
156. Terenius, L. A.: Endogenous peptides and analgesia *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18:189-204, 1978.
157. Traficante, L.I., Rotrosen, J., Siekierski, J., Tracer, H. and Gershon, S.: Enkephalin inactivation by N-terminal tyrosine cleavage: purification and partial characterization of a highly specific enzyme form human brain. *Life Sci.* 26:1697-1706, 1980.
158. Tseng, L.F., Ostwald, T.J., Loh, H.H. and Li, C.H.: Behavioral activities of opioid peptides and morphine sulfate in golden hamsters and rats. *Psychopharmacology* 64:215-218, 1979.
159. Vogel, Z. and Altstein, M.: The effect of puromycin on the biological activity of leu-enkephalin. *FEBS Letters* 98 (1):44-48, 1979.
160. Ward, S.J. and Takemori, A. E.: Determination of the relative involvement of mu-opioid receptors in opioid induced depression of respiratory rate by use of beta-funaltrexamine. *Eur. J. Pharmacol.* 87:1-6, 1983.
161. Watson, S.J., Khachateureau, H., Akil, H. et al: Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalin systems in brain. *Science.* 218:1134-1136, 1982.
162. Wei, E.T., Tseng, L.F., Loh, H.H. and Li, C.H.: Comparison of the behavioral effects of B-endorphins and enkephalin analogs. *Life Sci.* 21:321-327, 1977.
163. Weissman, B.A. and Zamir, N.: Differential effects of heroin on opioids levels in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 139:121-123, 1987.
164. Werz, M.A. and Mac Donald, R.L.: Opioid peptides with differential affinity for mu and delta receptors decrease sensory neuron calcium-dependent action potentials. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227:394-402, 1983.
165. Willis, G.L., The function of lateral hypothalamic catecholamine and endorphin systems in the control of motor performance. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 28:197-202, 1987.
166. Wood, P. L. and Fasternak, G.W.: Specific μ_2 opioid isoreceptor regulation of nigrostriatal neurons: in vivo evidence with naloxonazine. *Neurosci. Lett.* 37:291-293, 1983.

167. Woolfe, G. and MacDonald, A.D.: The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 80:300-307, 1944.
168. Yehuda, S. and Sheleff, P.: The effects of MIF-J, beta-endorphin and alfa-MSH on d-amphetamine induced paradoxical behavioral thermoregulation. Possible involvement of the dopaminergic system. *Peptides* 6:189-192, 1984.
169. Yoshikawa, K., Williams, C. and Sabol, S.: Rat brain preproenkephalin mRNA *J. Biol. Chem.* 259:14301-8, 1984.
170. Zhang, A.Z. and Pasternak, G.W.: Mu and delta opiate receptors: Correlation with high and low affinity opiate binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 67:323-324, 1980.
171. Zhang, S.Y., McGaugh, J.L., Juler, R.G. and Introini-Collison, I.B.: Naloxone and met-enkephalin effects on retention: Attenuation by adrenal denervation. *Eur. J. Pharmacol.* 138:37-44, 1987.
172. Zulin, R.S. and Zukin, S.R.: Multiple opiate receptors emerging concepts. *Life Sci.* 29:2681-2690, 1981.