

ACTUALIZACION POR TEMAS

Otro sistema de transmisión opioide en el cerebro de los mamíferos. Las endomorfinas y el receptor opioide mu Parte II

Philippe Leff*
Rodolfo Acevedo*
Armando Valdés*
Iván Martínez*
Aline Morales*
Juan Carlos Calva*
Benito Antón*

Summary

Several opioid peptides have been identified, cloned and subsequently characterized by pharmacological and molecular approaches. These peptides mediate a vast number of biological functions in discrete brain regions, where they activate the different opioid receptors subtypes referred to as mu, delta and kappa. These receptors belong to a class of G-protein coupled membrane receptors being structurally defined by seven peptide transmembrane domains. Opiate drugs mainly mediate their analgesic, euphoric and rewarding effects by activating the mu-opioid receptor subtype. Besides the detailed description of the anatomical expression of each opioid receptor subtype throughout the CNS of mammals, opioid receptors reveal a distinct but overlapping distribution as well as a single pharmacological profile. Moreover, opioid receptors activate a similar subcellular effector system, which involves a functional modulation of the adenylyl cyclase, protein kinases, phosphoinositide turnover as well as ion conductances such as calcium and potassium. Pharmacological studies related to the structure-activity relationships of the cloned opioid receptors expressed in heterologous cellular systems have revealed that natural occurring opioid peptides selectively bind with differential affinities to the different opioid receptor subtypes. Thus, *enkephalins* display a preferential binding to the delta opioid receptor while *dynorphins* are considered the selective endogenous ligands for the kappa-opioid receptor. Furthermore, no endogenous peptide agonist ligands displaying high affinity binding for the mu opioid receptor subtype have been identified. Recently, two novel endogenous opioid peptides referred to as endomorphins were isolated and cloned from the CNS of mammals. The pharmacological and functional

properties of these two peptides have just begun. In line with these investigations, initial studies have shown that endomorphins display the highest affinity binding for the mu opioid receptor reported to date as well as a very potent and prolonged analgesic activity in rodents.

Key words: Opiate receptors, agonists ligands, endomorphins, endogenous opiates.

Resumen

Diversos péptidos opioides han sido identificados, clonados y caracterizados a nivel molecular y farmacológico en múltiples especies de mamíferos, incluyendo el humano. Estas sustancias endógenas tienen la particularidad de regular una amplia gama de funciones biológicas en diferentes regiones del sistema nervioso donde se expresan conjuntamente sus receptores de unión específica y de alta afinidad. Entre las funciones neurales en las que ejercen acciones modulatorias los péptidos opioides se encuentran la analgesia, la iniciación y consolidación del fenómeno adictivo, la activación o supresión de crisis epileptiformes, funciones motoras y de termorregulación. Dentro de la familia de los péptidos opioides, las encefalinas se consideran como los agonistas endógenos preferenciales del receptor opioide delta (d), y las dinorfinas como los agonistas endógenos de alta afinidad de unión al receptor kappa (k). Diversos estudios de biología molecular han demostrado que estos dos subtipos de receptores opioides poseen una estructura conformacional similar y están acoplados a un sistema molecular homólogo de señalamiento intracelular mediado por la proteína Gi. En este contexto funcional, la unión específica de un ligando opioide endógeno a su receptor, produce la activación de la proteína Gi, y la inhibición subsecuente de esta proteína sobre la actividad de la adenilato-ciclase. Este último cambio funcional induce una disminución importante en la concentración intracelular del segundo mensajero AMPC. Finalmente, esta acción molecular conlleva subsecuentemente a la hiperpolarización neuronal

* Laboratorio de Neurobiología Molecular, División de Investigaciones Clínicas, Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calzada México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan., 14370, México D.F.

Recibido: 7 de octubre de 1999

Aceptado: 19 de octubre de 1999

debido a la inhibición de la corriente entrante del ion Ca^{2+} y a un incremento en la corriente saliente del ion K^+ . De esta forma se puede postular que la unión selectiva de los péptidos opioides endógenos a sus receptores específicos de alta afinidad en el cerebro de los mamíferos producen respuestas de hiperpolarización en las neuronas que expresan este sistema de neurotransmisión. Sin embargo, desde la identificación inicial de los péptidos opioides, a mediados de la década de los años 70, no se habían encontrado los ligandos peptídicos endógenos de alta afinidad de unión para el receptor opioide μ (**m**). Recientemente se informó del aislamiento y de la clonación molecular de dos nuevos péptidos endógenos con selectividad y alta afinidad de unión a este subtipo de receptor opioide. Estos dos péptidos son conocidos como la *endomorfina 1* y la *endomorfina 2*. La caracterización farmacológica inicial de estos dos nuevos tetrapéptidos opioides apenas ha comenzado, y algunos estudios muestran que ambas moléculas activan tanto *in vivo* como *in vitro* el receptor opioide **m** a través del sistema de señalamiento intracelular *Gi/adenilato ciclase/proteínas cinasas*, produciendo respuestas de hiperpolarización y disminución de la excitabilidad neuronal en las neuronas efectoras. Anatómicamente, ambos péptidos están ampliamente distribuidos en el SNC de los mamíferos, segregándose en forma importante en las regiones espinales y supraespinales relacionadas con la modulación de la transmisión y percepción de la información nociceptiva.

Palabras clave: Receptores opioides, ligandos agonistas, endomorfinas, opioides endógenos.

I. Caracterización molecular y funcional del receptor opioide μ

A partir de la identificación farmacológica de los diferentes subtipos de receptores opioides, μ , δ y κ (Simon, 1973; Terenius, 1973) y de la subsecuente identificación, aislamiento y caracterización molecular de los diferentes ligandos opioides endógenos (v.g., receptor μ - endorfinas; receptor δ - encefalinas; receptor κ - dinorfinas) (Hughes y col., 1975; Goldstein y col., 1979; Ling y col., 1976) se logró identificar, aislar, clonar y caracterizar molecular y farmacológicamente el receptor opioide δ en diferentes líneas celulares del roedor y del humano (Evans y col., 1992; Kieffer y col., 1992; Minami y Masamichi, 1995) continuando, subsecuentemente, con el aislamiento y la clonación de los receptores opioides μ y κ a partir del cerebro del ratón, de la rata y del humano (figura 1) (Kaufman y col., 1995; Minami y col., 1994; Minami y Masamichi, 1995). Estos estudios demostraron que los receptores opioides son glucoproteínas pertenecientes a una superfamilia de receptores membranales acoplados a proteínas *Go/Gi*, modulados por GTP (Lang, 1991; Evans y col., 1992; Kieffer y col., 1992; Reisine y col., 1996). Asimismo, estas observaciones experimentales dieron como resultado el hallazgo de que los diferentes subtipos de receptores opioides están conformados por siete dominios peptídicos transmembranales, con una alta homología en la secuencia de aminoácidos en estas regiones (60-70% de homología estructural entre los receptores μ , δ y κ). También se observó que estas proteínas receptoras muestran una alta divergencia estructural en sus extremos amino y carboxilo terminal, que conforman, respectivamente, los dominios extra e intracelulares (Fukuda y col., 1994). Diversos trabajos recientes de biología molecular han reportado la identificación, aislamiento y clonación

en diversos sistemas celulares eucarióticos (v.g., oocitos de *Xenopus Laevis*), de un subgrupo de proteínas membranales, denominadas proteínas modificadoras de la actividad del receptor (RAMP 1, RAMP 2, RAMP 3) y otros componentes citosólicos (v.g., factor componente de receptores, RCF). Estas moléculas se coexpresan con múltiples receptores protéicos a nivel membranal (v.g., el receptor de calcitonina, el receptor de la adrenomedulina y el receptor del péptido CGRP 1 y 2) (Food y Marshall, 1999). Estas proteínas denominadas RAMP 1, 2 y 3, así como el RCF parecen regular el transporte de estos receptores membranales a la superficie celular, determinando la actividad farmacológica de los receptores y regulando el estado de glucosilación y fosforilación de los mismos (Food y Marshall, 1999). Estos hallazgos podrían tener implicaciones funcionales importantes en la regulación de la actividad de los diferentes subtipos de receptores opioides, en particular la actividad funcional modulatoria del receptor opioide μ en fenómenos fisiológicos como la analgesia, y el síndrome adictivo a opiáceos tipo morfina y heroína.

En diversos estudios experimentales relacionados con la generación de proteínas mutantes y la formación de receptores opioides químéricos híbridos de los receptores opioides μ , y δ (Lai y col., 1995; Onogi y col., 1995) se ha demostrado que la secuencia consenso de aminoácidos que conforma la primera asa extracelular y la mitad de la región transmembranal III (TMIII) del receptor opioide μ , así como el fragmento transmembranal V-VII (TM V-VII) que integra las asas extracelulares II y III que conforma el receptor δ (figura 1 y 2) representan los dominios moleculares que determinan el reconocimiento selectivo y la afinidad de unión de los diferentes ligandos agonistas de naturaleza peptídica y no peptídica por los distintos subtipos de receptores opioides (Fukuda y col., 1995; Lazarus y col., 1996).

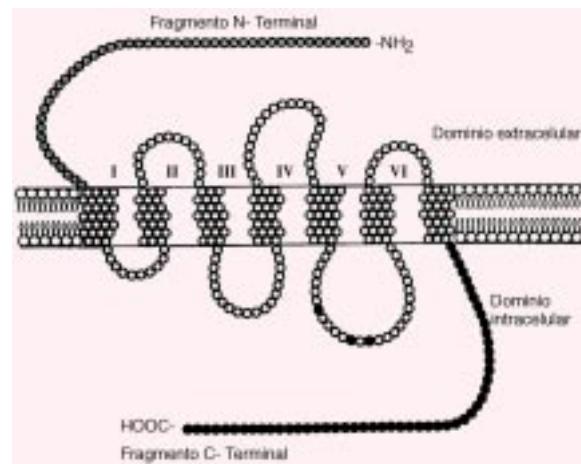


Figura 1. Estructura molecular común entre los subtipos de receptores opioides μ y κ . En la ilustración se muestran los dominios peptídicos transmembranales (I-VII) que guardan una gran homología estructural entre los tres subtipos de receptores opioides. Ambos extremos peptídicos, el amino-terminal (dominio extracelular) y el carboxilo-terminal (dominio intracelular), así como las regiones peptídicas de las asas extra e intracelulares, poseen divergencias estructurales que determinan la diferente selectividad y afinidad de unión de los diferentes ligandos agonistas opioides (adaptada por Reisine y col. [1996], y modificada por el primer autor de esta publicación).

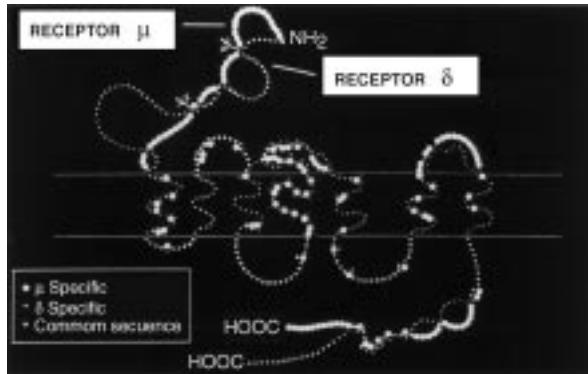


Figura 2. Estructuras del receptor opioide (μ) y el receptor opioide (δ). La representación esquemática muestra el traslapamiento de las estructuras polipeptídicas de ambos receptores opioides: (*) receptor opioide (μ); (*) receptor (δ). La región transmembranal de ambos receptores muestra secuencias consenso comunes entre ambas proteínas (adaptada por Lazarus y col. [1996], y modificado por el primer autor de esta publicación).

Como extensión a estas observaciones experimentales, las cuales han mostrado que hay relación entre la estructura molecular de los receptores opioides y los sitios responsables de la unión de los diferentes agonistas opioides, también se ha observado que la activación de estas proteínas receptoras por sus ligandos agonistas, produce un importante decremento del tono basal del sistema de señalamiento intracelular conformado por la *adenilato-ciclasa*, el *AMPc* y las *proteínas cinasas*; sistema de señalamiento intracelular que en conjunto produce una inhibición importante en la corriente entrante de calcio y un incremento simultáneo en la corriente saliente (corriente rectificadora) del ion potasio. Todos estos eventos moleculares conllevan a la generación de una respuesta de hiperpolarización neuronal y a la disminución de la excitabilidad neuronal (Childer, 1991; Jin y col., 1994; Li y Chang, 1996).

Por otro lado, también se ha demostrado que los receptores opioides μ y δ , clonados y expresados en líneas tumorales de ratón de estirpe neuroendocrina (v.g., AtT20) son funcionalmente regulados en forma diferencial por la exposición a diferentes ligandos agonistas, mostrándose que estos receptores poseen diferentes grados de sensibilización, diferentes formas de desacoplamiento del receptor/proteína G_i /adenilato-ciclasa, así como de una regulación diferencial a nivel de la inhibición de la corriente entrante del ion calcio y de la corriente saliente del ion potasio (Tallent y col., 1998). Asimismo, diversos estudios experimentales relacionados con el desarrollo y la generación de animales mutantes transgénicos a través de la generación de roedores mutantes homocigotos con deficiencia de la expresión genotípica y fenotípica del gene que codifica el subtipo de receptor opioide μ , se identificó que este subtipo de receptor es el responsable casi exclusivo de la regulación de la antinocicepción y del síndrome adictivo que producen los alcaloides opiáceos del tipo de la morfina y de la heroína (Matthes y col., 1996; Sora y col., 1997).

Los estudios inmunohistoquímicos centrados en la colocalización neuronal de los receptores opioides μ y δ

en las neuronas encefalíngicas de proyección, que forman las vías estriatopalidales (estriado-globo pálido / globo pálido ventral) en el cerebro de los mamíferos (v.g., rata) han demostrado que el receptor opioide δ se expresa preferencialmente a nivel postsináptico en el soma de las neuronas palidales; en tanto que el receptor opioide μ se expresa preferencialmente a nivel presináptico y postsináptico en las neuronas encefalíngicas localizadas en el núcleo palidal (Olive y col., 1997). Estos estudios sugieren que la liberación de los péptidos opioides endógenos, como las encefalinas, en estas regiones anatómicas del cerebro, son reguladas por la actividad del receptor opioide μ localizado en las neuronas encefalíngicas estriatopalidales, y por el receptor opioide δ , localizado a nivel posináptico en neuronas de proyección pálido-estriatal (Olive y col., 1997). Asimismo, la distribución neuronal de los diferentes subtipos de receptores opioides en áreas neuroanatómicas relacionadas con la percepción y la modulación de la transmisión nociceptiva, sugiere que estos receptores desempeñan un papel funcional importante en los mecanismos que regulan la liberación fisiológica de diversos péptidos opioides, incluyendo los nuevos ligandos peptídicos naturales del receptor opioide μ , y las endomorfinas 1 y 2 a nivel espinal y supraespinal.

II). Las endomorfinas y el receptor opioide μ : Importancia funcional de este sistema de transmisión en la modulación de las vías de transmisión nociceptiva

Uno de los descubrimientos más sobresalientes en el campo de la neurofarmacología y la neuroquímica de los sistemas de transmisión opioide, es el que se refiere a la identificación, aislamiento y caracterización molecular y farmacológica de dos nuevos tetrapéptidos amidos, denominados *endomorfina 1* (Tir-Pro-Tri-Fen-NH₂) y *endomorfina 2* (Tir-Pro-Fen-Fen-NH₂). Estos dos péptidos poseen la más alta afinidad y selectividad de unión al receptor opioide μ (v.g., K_d = 1-2 nM) (Zadina y col., 1997). Ambos péptidos, aislados del cerebro de bovinos y del tejido cerebral humano (Zadina y col., 1997; Hackler y col., 1997), fueron identificados inicialmente mediante la síntesis de análogos estructurales, a partir del análogo peptídico Tir-W-MIF-I, demostrándose que estos péptidos poseen una mayor afinidad de unión por el subtipo del receptor opioide μ (Hackler y col., 1994; Zadina y col., 1997). Asimismo, ambas endomorfinas han demostrado ejercer un efecto analgésico potente en los ratones, con un rango de potencia similar al reportado para la morfina, cuando se administran a nivel supraespinal (v.g., ICV) o espinal (v.g., intratecal) (Zadina y col., 1997; Stone y col., 1997).

Este efecto analgésico generado por las endomorfinas parece estar mediado por el efecto que tienen estos péptidos, que consiste en inhibir los potenciales postsinápticos excitatorios y por la generación subsecuente de respuestas de hiperpolarización en las neuronas de la sustancia gelatinosa de la médula espinal (Wu y col., 1999). Además, estos péptidos no sólo median un potente efecto antinociceptivo en modelos animales con dolor de tipo crónico (Prezewlocka

y col., 1999), sino también inducen el desarrollo de efectos hipotensivos cuando son administrados sistémicamente (v.g., IV) (Champion, 1997). Si bien ambos péptidos son capaces de activar el sistema de señalamiento intracelular de las proteínas Gi/Go mediante la activación del receptor opioide μ , también son capaces de inhibir la activación de la vía metabólica del *adenilato-ciclasa/AMPc/ proteínas cinasas* (v.g., en las células transfectadas con el gen que codifica el receptor opioide μ) (Hoshata y col., 1998; Gong y col., 1998), generando respuestas de inhibición en la corriente entrante de Ca^{2+} a dosis fisiológicas (IC_{50} , E-1, 7.7 nM; IC_{50} , E-2, 23.4 nM) (Higashida y col., 1998), e incrementando la corriente saliente (rectificadora) del ion K^+ (Gong y col., 1998).

Este conjunto de observaciones experimentales ha permitido postular que las *endomorfinas 1 y 2* son dos nuevos *neurotransmisores* funcionalmente relevantes en el señalamiento químico opioide en el SNC de mamíferos, con capacidad de modular los procesos neurofisiológicos específicos, como es el caso de la antinocicepción (Higashida y col., 1998). En adición a estos hallazgos, diversos estudios neuroanatómicos han mostrado que ambas moléculas, además de encontrarse ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central de los mamíferos, incluyendo las áreas de transmisión nociceptiva (Martin-Schild y col., 1997, 1999; Schreff y col., 1998), también son capaces de activar al receptor opioide μ , en las líneas celulares transfectadas con este receptor (Hoshata y col., 1998; Gong y col., 1998), induciendo la rápida internalización de este receptor en cultivo primario de neuronas (McConalogue y col., 1999). Esta última alteración sobre la distribución celular del receptor opioide μ , inducida por estos dos ligandos agonistas endógenos, también se ha observado *in vitro* en cultivos primarios de células tumorales posterior a la aplicación aguda de alcaloides opiáceos (v.g., dihidroetorfina, DAMGO) (Keith y col., 1998; Sternini y col., 1996), e *in vivo* en el sistema nervioso central, después de la administración parenteral de éstos en el roedor (Keith y col., 1998). En conjunto, estas observaciones y resultados experimentales han permitido apoyar la hipótesis de que estos agonistas endógenos, las *endomorfinas*, ejercen sus efectos opioideos activando en forma específica y selectiva el subtipo de receptor opioide μ , en las neuronas del SNC de los mamíferos, en forma similar a como lo activan los alcaloides opiáceos tipo morfina y heroína, modulando, de esta forma, la transmisión nociceptinérgica y otros sistemas de neurotransmisión que intervienen en el inicio, desarrollo y consolidación del fenómeno adictivo, como es el sistema de transmisión dopamínérgico del sistema meso-cortico-límbico (McConalogue, y col., 1999; Chang y col. 1982; Zadina y col., 1990, 1993, 1994; Harrison y col., 1998; Tallent y col., 1998).

III). Localización anatómica y celular de las endomorfinas 1 y 2 y del receptor opioide μ en el sistema nervioso central del roedor

Después de los estudios iniciales que permitieron la identificación y aislamiento de las endomorfinas a partir del cerebro de bovino (Zadina y col., 1997) y de humano

(Hackler y col., 1997), se logró identificar inicialmente la inmunorreactividad positiva al tetrapéptido endomorfina-2 (E-2-IR) en las aferentes primarias de las capas superficiales de la médula espinal en fibras de grueso y mediano calibre, así como en los distintos núcleos sensoriales y motores del bulbo raquídeo de la rata (Martin-Schild y col., 1997); áreas donde se ha observado una alta densidad de expresión del receptor opioide μ (Mansour y col., 1995). Aunque inicialmente se había detectado por radioinmunoensayo (RIA) la presencia de la E-1 en diferentes regiones del cerebro de la rata (Zadina y col., 1997), estudios posteriores empleando antisueros (no purificados) para las *endomorfinas 1 y 2* (Martin-Schild y col., 1997), así como sueros específicos, purificados por afinidad de antígeno (Anton y col., 1998), han mostrado una expresión inmunorreactiva diferencial de ambas endomorfinas en diferentes regiones neuroanatómicas y celulares del cerebro de la rata (Anton y col., 1998; Martin-Schild y col., 1999). Estos últimos estudios apoyan la hipótesis de que la inmunorreactividad a E-1, localizada tanto en fibras como en somas neuronales, se distribuye predominantemente en múltiples áreas cerebrales en mayor proporción que la inmunorreactividad a la E-2. En contraposición a la E-1, la distribución del material inmunorreactivo a E-2 se localiza, preferencialmente, en el neurópilo de diversos núcleos sensoriales y motores del tallo cerebral, y en las regiones de procesamiento nociceptivo de la médula espinal (Anton y col., 1998; Martin-Schild y col., 1999). Por ejemplo, una alta densidad de fibras inmunorreactivas a la E-1 se distribuye en áreas telencefálicas, diencefálicas y mesencefálicas, en tanto que la mayor parte de fibras inmunorreactivas a las E-2 parece localizarse en el complejo trigeminal y en las capas superficiales del cuerno dorsal de la médula espinal (Anton y col., 1998; Martin-Schild y col., 1999). Estos patrones de distribución diferencial de ambos péptidos también se observan en diferentes especies de roedores (v.g., rata, ratón y cuyo) (Martin-Schild y col., 1999). Aunque en algunas regiones anatómicas no parece coincidir la distribución inmunorreactiva de las endomorfinas con la expresión inmunorreactiva del receptor opioide μ (Anton y col., 1998; Martin-Schild y col., 1999), la expresión inmunorreactiva de este receptor (Mansour y col., 1987, 1995) parece ser idéntica en las estructuras neurales de diversas áreas telencefálicas y del tallo cerebral que expresan una inmunorreactividad positiva a la E-1, similar a la de las estructuras neurales que expresan la inmunorreactividad a las E-2 en el tallo cerebral y en la médula espinal (Martin-Schild y col., 1999).

IV). Anatomía funcional de la colocalización inmunorreactiva de las endomorfinas y del receptor opioide μ

Los estudios antes descritos sobre la distribución anatómica y celular de las endomorfinas en fibras “endomorfínergicas” en áreas neurales donde se localizan los cuerpos neuronales que expresan el receptor opioide μ , apoyan la hipótesis de que la liberación fisiológica de las endomorfinas a este nivel anatómico pudiera activar estos receptores opioides a nivel

postsináptico, en tanto que en las áreas en las que se expresan y localizan tanto las endomorfinas como el receptor opioide μ en las fibras neuronales, podría relacionarse con la activación no sináptica de este receptor por sus ligandos peptídicos. Adicionalmente, la coexpresión de ambas moléculas (v.g., endomorfinas y receptor μ) en los cuerpos neuronales sugiere que estos péptidos pudieran ser transportados a través de fibras axonales y dendríticas para, finalmente, ser segregados a las terminales sinápticas en donde al liberarse modularían la actividad presináptica del receptor opioide μ (Martin-Schild y col., 1999). En apoyo a es-

tas propuestas funcionales se ha demostrado que algunas fibras aferentes del cuerno dorsal de la médula espinal de la rata coexpresan simultáneamente la E-2 y la sustancia P (E-2/SP) (Martin-Schild y col., 1997, 1998), así como la E-2 y el péptido bioactivo CGRP (el péptido relacionado con el gen de la calcitonina) (Pierce y col., 1998). Estos hallazgos permiten proponer que la liberación de la E-2 pudiera ejercer un efecto de inhibición presináptico sobre la liberación de la SP o del péptido CGRP por medio de la activación del receptor opioide μ localizado en la presinapsis de estas neuronas peptidérgicas (Martin-Schild y col., 1999).

REFERENCIAS

1. ANTON B, MARTINEZ I, CALVA JC, VALDEZ A, LEÓN - OLEA M, LEFF P: Immunohistochemistry for endomorphins in the rat CNS. *Neurosci Abstr*, 24(1):851, 1998.
2. CHAMPION HC, ZADINA JE, KASTIN AB, HACKLER L, GE LJ, KADOWITZ PJ: The endogenous mu-opioid receptor agonists endomorphins 1 and 2 have novel hypotensive activity in the rabbit. *Biochem Biophys Res Com*, 235:567-570, 1997.
3. CHANG KJ, CUATRECASAS P, WEI ET, CHANG JK: Analgesic activity of intracerebroventricular administration of morphiceptin and beta-casomorphins: correlation with the morphine(micro) receptor binding affinity. *Life Sci*, 30(18):1547-51, 1982.
4. CHILDER SR: Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sci*, 48:1991-1998, 1991.
5. EVANS C, KEITH DE, MORRISON H, MAGENDZO K, EDWARDS RH: Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, 258:1952-1955, 1992.
6. FOORD SM, MARSHALL FH: RAMPs: accessory proteins 6 for seven transmembrane domain receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 20:184-187, 1999.
7. FUKUDA K, KATO S, MORI K, NISHI M, TAKESHIMA H, IWABE M, MIYATA T, HOUTINI, T, SUGIMOTO T: cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett*, 343:42-46, 1994.
8. FUKUDA K, KATA S, MORI K: Localization of regions of the opioid receptor involved in selective agonist binding. *JBC*, 270: 6702-6709, 1995.
9. GOLDSTEIN A, TACHIBANA S, LOWNEY LI, HUNKAPILLER M, HOOD L: Dynorphin 1-13, an extraordinary potent opioid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:1145-1148, 1979.
10. GONG J, STRONG JA, ZHANG S, YUE X, DEHAVEN RN, DAUBERT JD, CASSEL JA, YU G, MANSSON E, YU L: Endomorphins fully activate a cloned human mu opioid receptor. *FEBS Letters*, 439:152-156, 1998.
11. HACKLER L, ZADINA J, GE LG, KASTIN AJ: Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human cortex. *Peptides*, 18(10):1635-1639, 1997.
12. HACKLER L, KASTIN AJ, ERCHEGYI J, ZADINA JE: Isolation of Tyr-W-MIF-1 from bovine hypothalamus. *Neuropeptides*, 24:159-164, 1993.
13. HIGASHIDA H, HOSHI N, KNIJINK R, ZADINA JE, KASTIN AJ: Endomorphins inhibit high-threshold Ca^{2+} channel currents in rodent NG108-15 cells overexpressing mu opioid receptor. *J Physiol*, 507(1):70-75, 1998.
14. HOSHATA K, BURKEY TH, ALFARO-LOPEZ J, VARGA E, HRUBY VJ, ROESKE WR, YAMAMURA HL: Endomorphin-1 and endomorphin-2 are partial agonists at the human mu opioid receptor. *Eur J Pharmacol*, 346:111-114, 1998.
15. HUGHES J, SMITH T, KOSTERLITZ HW, FOTHERGILL L, MORGAN BA, MORRIS HR: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258:577-579, 1975.
16. JIN W, LEE NM, LOH HH, THAYER SA: Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *J Neurosci*, 14:1920-1929, 1994.
17. KEIFFER BL, BEFORT K, GAVERIAUX-RUFF C, HIRTH CG: The delta opioid receptor: isolation of a cDNA by expression, cloning and pharmaceutical characterization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:12048-120452, 1992.
18. KEITH DE, ANTON B, MURRAY RS, ZAKI P, CHU PC, LISSIN DV, MONTEILLET-AUGIS G, STEWART PL, EVANS CJ, VON ZASTROW M: μ -opioid receptor internalization: Opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. *Mol Pharmacol*, 53:377-384, 1998.
19. LAI J, BILSKY EJ, PORRECA F: Treatment with antisense oligodeoxynucleotide to a conserved sequence of opioid receptors inhibits antinociceptive effects of delta subtype selective ligands. *J Receptor Sign Transduct Res*, 15:643-650, 1995.
20. LANG J: Guanine nucleotide binding proteins and their coupling to opioid receptors. En: *Neurobiology of Opioids*, Almeida OFX, Shippenberg TS (eds.), pp. 121-140, Springer-Verlag, Heidelberg, 1991.
21. LAZARUS LH, BRYANT SD, SALVADORI S, ATTILA M, JONES LS: Opioid infidelity: novel opioid peptides with dual high affinity for δ and μ -receptors. *Trends Neurosci*, 19(1):31-35, 1996.
22. LI LY, CHANG KJ: The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol*, 50:599-602, 1996.
23. LING N, BURGUS R, GUILLEMIN R: Isolation, primary structure and synthesis of the alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:3042-46, 1976.
24. MANSOUR A, FOX CA, AKIL H, WATSON SJ: Opioid receptor RNAm expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci*, 18(1):22-29, 1995.
25. MANSOUR A, KHACHATURIAN H, LEWIS ME, AKIL H, WATSON SJ: Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa opioid receptor in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci*, 7:2445-64, 1987.
26. MANSOUR A, KHACHATURIAN H, LEWIS ME, AKIL H, WATSON SJ: Anatomy of CNS opioid receptor. *Trends Neurosci*, 11:308-314, 1988.
27. MARTIN-SCHILD S, GERALL AA, KASTIN AJ, ZADINA JE: Differential distribution of endomorphin 1 and endomorphin-2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol*, 405:450-17, 1999.
27. MARTIN-SCHILD S, ZADINA JE, GERALL AA, VIGH S, KASTIN AJ: Localization of endomorphin-2-like immunoreactivity in the rat medulla and spinal cord. *Peptides*, 18(10):1641-49, 1997.
28. MCCONAUGHEY K, GRADY EF, MINNIS J, BALESTRA B, TONINI M, BRECHA NC, BUNNELL NW, STERNINI

- C: Activation and internalization of the mu opioid receptor by newly discovered agonists, endomorphin-1 and endomorphin-2. *Neurosci*, 90(3):1051-1059, 1999.
29. MATTHES HWD, MALDONADO R, SIMONIN O, VALVERDE S, SLOWE I, KITCHEN K, BEFORT A, DIERICH M, LE MEUR P, DOLLE E, TZAVARA J, HANOUNE BP, ROQUE BP, KIEFFER BL: Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid receptor gene. *Nature*, 383:819-823, 1996.
30. MINAMI M, ONOGI T, TOYA Y, KATAO Y, MAEKAWA S, KATSUMATA S, YABUCHI K, SATOH M: Molecular cloning and *in situ* hybridization histochemistry for rat μ opioid-receptor. *Neurosci Res*, 18:315-322, 1994.
31. MINAMI M, MASAMICHI S: Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res*, 23:121-145, 1995.
32. FOSTER MO, ANTON B, MICEVYCH P, EVANS CJ, MAIDMENT N: Presynaptic versus postsynaptic localization of mu and delta opioid receptors in dorsal and ventral straitopallidal pathways. *J Neurosci*, 17(19):7471-7479, 1997.
33. ONOGI T, MINAMI M, KATAO Y, NAKAGAWA T, AOKI Y, TOYA T, KATSUMATA S, SATOH M: DAMGO, a mu opioid receptor selective agonist, distinguishes between mu and delta opioid receptors around their first extracellular loops. *FEBS Lett*, 357:93-97, 1995.
34. PRZEWLICKA B, MIKA J, LABUZ D, TOTH G, PRZEWLICKI R: Spinal analgesic action of endorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol*, 367:189-196, 1999.
35. REISINE T, LAW F, BLAKE A, TALLENT M: Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G protein effects systems. *Ann NY Acad Sci*, 780:168-175, 1996.
36. SCHREFF M, SCHULZ S, WILBORNÝ D, HÖLT V: Immunofluorescent identification of endomorphin-2 containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord. *Neuroreport*, 9:1031-34, 1998.
37. SIMON EJ, HILLER JH, EDELMAN J: Stereospecific binding of potent narcotic analgesic 3 H-*etorphine* in rat brain homogmates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70:1947-49, 1973.
38. SORA I, TAKAHASHI N, FUNADA M, UJIKE H, REVAY RS, DONOVAN DM, MINER LL, UHL GR: Opiate receptor knco-outmice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:1544-1549, 1997.
39. STERNINI C, SPANN M, ANTON B, KEITH DE, BUNNETT NW, VON ZASTROW M, EVANS C, BRECHA NC: Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:9241-9246, 1996.
40. STONE LS, FAIRBANKS CA, LAUGHLIN TM, NGUYEN HO, BUSHY TM, WESSENDORFF MW, WILCOX GL: Spinal analgesic actions of the new endogenous peptides endomorphin-1 and -2. *Neuroreport*, 8:3131-3135, 1997.
41. TALLENT M, DICHTER MA, REISNE T: Differential regulation of the cloned kappa and mu opioid receptors. *Neurosci*, 85(3):873-885, 1998.
42. TERENIUS L: Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol*, 32:317-320, 1973.
43. WU SY, DUN SL, WRIGHT MT, CHANG JK, DUN NJ: Endomorphin-like immunoreactivity in the rat dorsal horn and inhibition of substantia gelatinosa neurons *in vitro*. *Neuroscience*, 89(2):317-321, 1999.
44. ZADINA JE, HACKLER L, GE LJ, KASTIN AJ: A potent and selective endogenous amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 for the μ opiate receptor. *Nature*, 386:449-502, 1997.
45. ZADINA JE, KASTIN AJ, GE L-G, HACKLER L: Mu, delta and kappa opiate receptor binding of Tyr-W-MIF-1 and of Tyr-W-MIF-1, its active fragments and two potent analogs. *Life Sci*, 55:PL461-466, 1994.
46. ZADINA JE, KASTIN AJ, GE L-G, BRANTL V: Hemorphins, cytochrophins and human B-casomorphins bind to antiopiate (Tyr-MIF-1) as well as opiate binding sites in the rat brain. *Life Sci*, 47:PL25, 1990.

DIRECTORIO DEL INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRÍA

- Dr. Ramón de la Fuente
Director Emérito
- Dr. Gerardo Heinze Martín
Director General
- Dr. Humberto Nicolini S.
Jefe de la División de Investigaciones Clínicas
- Dr. Augusto Fernández-Guardiola
Jefe de la División de Investigaciones en Neurociencias
- Dra. Ma. Elena Medina-Mora
Jefe de la División de Investigaciones Epidemiológicas y Sociales
- Dr. José García Marín
Jefe de la División de Servicios Clínicos
- Dra. Blanca E. Vargas
Jefe de la División de Enseñanza