

Efecto de la adicción a opiáceos en el metabolismo opioide endógeno

(Effects of the addiction to opiates in endogenous opioid metabolism)

Irazusta Astiazaran, Jon
Gil Goikouria, Javier
Fernández Osorio, David
Varona Gutiérrez, Adolfo
Laminaga Enbeita, Gorka
Univ. del País Vasco
Fac. de Medicina y Odontología
Dpto. de Fisiología
Samiena, s/n
48940 Leioa

Maza Cano, José Luis
Univ. del País Vasco
Fac. de Medicina y Odontología
Dpto. de Estomatología
Samiena, s/n
48940 Leioa

BIBLID [1577-8533 (2001), 4; 37-50]

El problema de la adicción a sustancias opiáceas es uno de los problemas más graves de las sociedades modernas. A pesar de que los estudios sobre las bases moleculares de este fenómeno son abundantes, existe controversia acerca de lo que ocurre a nivel del sistema opioide endógeno (encefalinas, endorfinas, dinorfinas). En el presente trabajo describiremos el efecto de la dependencia a opiáceos sobre enzimas degradadores de péptidos opioides y otros péptidos en determinadas regiones cerebrales de humanos con antecedentes de adicción a heroína.

Palabras Clave: Adicción. Heroína. Opioides. Encefalinas. Aminopeptidasas.

Gai opiazeoen zaletasuna gizarte modernoan arazo larrienetako bat da. Fenomeno horren oinarri molekularrei buruzko ikerlanak ugari badira ere, sistema opioide endogenoaren mailan (entzefalinak, endorfinak, dinorfinak) gertatzen dena eztabaidagai dugu gaur egun. Heroinaren zaletasunak joriko gizakien garuneko zenbait aldetan opiazeoen menpekotasunak peptido opioide eta bestelako opioideen entzima degradatzaileen gainean duen eragina deskribatuko dugu lan honetan.

Giltz-Hitzak: Menpekotasuna. Heroína. Opioidak. Entzefalinak. Aminopeptidasak.

Le problème de la dépendance aux substances opiacées est l'un des problèmes les plus graves des sociétés modernes. Bien qu'il existe de nombreuses études sur les bases moléculaires de ce phénomène, il existe une controverse sur ce qui arrive au niveau du système opioide endogène (encephalines, endorphines, dynorphines). Dans ce travail, nous décrivons l'effet de la dépendance aux opiacées sur enzymes dégradateurs de peptides opioides et autres peptides dans des régions déterminées du cerveau d'humains ayant des antécédents de dépendance à l'héroïne.

Mots Clés. Dépendance. Héroïne. Opioides. Encéphalines. Aminopeptidasas.

INTRODUCCIÓN

El problema de la drogadicción y en concreto el de la adicción a sustancias opiáceas como la heroína es uno de los problemas más graves de las sociedades modernas. Por ello, y debido a su especial incidencia en nuestro país son importantes todos los estudios que nos ayuden a entender las bases bioquímicas de este fenómeno.

HISTORIA

El opio, que se extrae de la adormidera (*papaver somniferum* o *papaver setigerum*²), se ha usado por sus efectos psicoactivos probablemente desde hace más tiempo que cualquier otro narcótico, si exceptuamos quizás el alcohol¹. Los griegos y los romanos utilizaron el opio con fines placenteros y medicinales, lo cual se observa en diferentes grabados de aquellas épocas.

En 1805, Friedrich Sertürner, químico alemán obtuvo morfina pura de la adormidera y una de las ventajas de las sustancias químicas puras sobre los extractos vegetales es que una vez diluidas en soluciones acuosas pueden inyectarse directamente en el torrente sanguíneo. Es por ello que ya a partir de mediados del siglo XIX la utilización de la morfina inyectable con fines analgésicos empieza a generalizarse, sobre todo en épocas de guerra. Así, fueron tantos los combatientes que al regresar a sus hogares se habían hecho adictos a la morfina, que se dio en llamar a la morfínomanía la “enfermedad del soldado”.

La plaga que en nuestro siglo constituye la adicción a opiáceos gira en torno al abuso de la heroína más que al de la morfina. La heroína es un derivado químico sumamente simple que se obtiene añadiendo a la morfina dos grupos acetilo que aumentan la capacidad de la droga para disolverse en los lípidos cerebrales, de ahí que se logre un más rápido “arrebato” de euforia tras su inyección intravenosa.

ESTADO ACTUAL DEL TEMA

A pesar de que los derivados del opio han sido utilizados desde hace mucho tiempo contra el dolor sus receptores no han comenzado a describirse hasta hace 25 años cuando en 1973 varios grupos de investigación consiguieron identificar la unión de opiáceos radiactivos a sus receptores en los tejidos cerebrales y distinguir las interacciones específicas opiáceo-receptor de las uniones inespecíficas de los opiáceos a los tejidos del cerebro³⁻⁴⁻⁵. Hoy en día ya se conocen 3 tipos diferentes de receptores de opiáceos que son los receptores⁶ m, d y k. Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas G, en concreto a Gi/Go⁷. La activación del receptor y de estas proteínas provoca inhibición de la adenilciclasa con reducción del AMPc, apertura de canales de potasio y cierre de canales de calcio. El aumento de

conductancia de potasio, que sale al exterior de la neurona provocará una inhibición de la actividad bioeléctrica neuronal; el cierre de canales de calcio da lugar a la inhibición de la liberación del neurotransmisor. Ambas confirman la respuesta neuronal típica a la acción de los opiáceos que se traduce en los signos y síntomas típicos que provocan (analgesia, indiferencia hacia los estímulos ambientales, etc.).

Al ir describiéndose receptores opioides en el SNC y otros tejidos (como el intestino por ejemplo) era lógico pensar que estos receptores fueron diseñados por la naturaleza como receptores de algún neurotransmisor presente. Así, en 1975 se identificaron los dos primeros ligandos endógenos de carácter neuropeptídico capaces de interactuar específicamente con el receptor opioide, la Met-Encefalina y la Leu-Encefalina⁸. Posteriormente, se fueron describiendo más péptidos naturales como las Endorfinas, Dinorfinas, etc.

PÉPTIDOS OPIOIDES ENDÓGENOS

Los péptidos opioides endógenos se sintetizan en el SNC a partir de grandes precursores peptídicos. Una vez sintetizados y transportados en dirección axonal se acumulan en las terminaciones nerviosas dentro de vesículas: Tras su liberación al espacio sináptico las encefalinas interactúan fundamentalmente con receptores δ y las endorfinas con receptores m y k^{6-9} , para ser posteriormente degradadas por peptidasas que hidrolizan al péptido biológicamente activo en fragmentos inactivos.

MET-Encefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met.

LEU-Encefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

Hoy en día se considera que las dos vías principales de degradación de encefalinas se producen por la hidrólisis del enlace Tyr-Gly llevada a cabo por aminopeptidasas y del enlace Gly-Phe realizada por una endopeptidasa conocida como Encefalinasa. Dentro de las aminopeptidasas se han descrito tres con gran afinidad por las encefalinas.

1: Ala aminopeptidasa: Enzima soluble y sensible a puromicina (es inhibido por esta)

2: Ala aminopeptidasa MII: Enzima unida a membrana y sensible a puromicina (es inhibido por esta).

3: Aminopeptidasa M: Enzima localizada en membrana e insensible a puromicina

En general existe un mayor conocimiento sobre el papel fisiológico de las peptidasas unidas a membrana, pero en la actualidad están apareciendo evidencias que refuerzan el papel de las peptidasas solubles¹⁰.

USO CRÓNICO DE OPIÁCEOS: NEUROADAPTACIÓN

La administración repetida de opiáceos desencadena en el individuo un fenómeno conocido como dependencia física o neuroadaptación que se caracteriza por la necesidad de mantener unos niveles determinados de droga en el organismo, desarrollándose un vínculo droga-organismo¹¹. Sus dos componentes principales son: la tolerancia y el síndrome de abstinencia.

Se entiende por tolerancia la disminución progresiva de los efectos de una sustancia a medida que se consume de forma reiterada o, en otras palabras, la necesidad de ir aumentando progresivamente la dosis con el fin de alcanzar los efectos iniciales. Los opiáceos como la heroína y la morfina desarrollan tolerancia a muchos de sus efectos (sobre todo los efectos depresores del SNC) con relativa rapidez.

Cuando la administración del opiáceo se suspende bruscamente o se administra un antagonista, se presenta un cuadro denominado síndrome de abstinencia o de retirada con intensa sintomatología central y vegetativa contraria a la que se da tras la administración aguda de la droga. En este fenómeno se ha descrito una hiperactividad de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus¹²⁻¹³ que puede atenuarse con la administración de α_2 agonistas como la clonidina¹²⁻¹⁴.

Los mecanismos moleculares y celulares de esta adaptación neuronal no son del todo conocidos.

La desensibilización (desacoplamiento entre receptor y proteína G), la regulación a la baja de los receptores opioides (por internalización o pérdida neta de proteína receptora) y los fenómenos postreceptor (por ejemplo la regulación hacia arriba de varios enzimas efectores del sistema adenilil ciclasa) parecen jugar un papel importante¹³⁻¹⁵.

Dentro de los fenómenos postreceptor, los datos existentes sobre el efecto que tiene la exposición crónica y la abstinencia a opiáceos en el sistema opioide endógeno son numerosos y algo contradictorios. Se han descrito descensos en los niveles de RNAm de la proencefalina¹⁶ y prodinorfina¹⁷ en el estriado e hipotálamo de ratas expuestas crónicamente a morfina¹⁸, mientras que los niveles de péptidos opioides parecen normales¹⁹ o incluso incrementados²⁰.

Los inhibidores de enzimas responsables de degradar opioides endógenos han sido descritos desde hace algunos años²¹ y se han sugerido como analgésicos con menor poder adictivo que los opiáceos en animales de experimentación.

OBJETIVOS

Con el fin de observar si la adicción a opiáceos afecta al sistema opioide endógeno, o más concretamente, a sus enzimas degradadoras, nuestro proyecto se basa en la determinación de la actividad de tres aminopeptidasas implica-

das en la degradación de encefalinas (Alanina aminopeptidasa soluble, Ala AP MII y Ala AP M) en zonas específicas de cerebro de humanos postmortem adictos a opiáceos. También tenemos como objetivo determinar otras actividades peptidásicas que degradan otros péptidos cerebrales (TRH, LHRH, Neurotensina, Bombesina, etc.) para ver si existe alguna alguna variación.

METODOLOGÍA

En el presente proyecto se van a determinar diferentes actividades peptidásicas en los fenómenos de adicción y abstinencia a opiáceos. Estas determinaciones se realizarán en muestras postmortem de humanos y en modelos animales:

- Tres enzimas degradadoras de encefalinas: Alanina aminopeptidasa (EC 3.4.11.2): soluble y unida a membrana (MII) y Aminopeptidasa M. Sus resultados nos podrían orientar algo sobre el metabolismo opioide endógeno en el fenómeno de dependencia a opiáceos.
- Peptidasas degradadoras de otros péptidos cerebrales: Prolil endopeptidasa (EC 3.4.21.26) y piroglutamil aminopeptidasa I (EC 3.4.19.3): Enzimas que aparecen en la fracción soluble y en la unida a membrana y que degradan el tripéptido TRH, la hormona luteinizante, etc.
- Peptidasas degradadoras de oligopéptidos generados en el curso de la hidrólisis de proteínas: Leucina aminopeptidasa (EC 3.4.11.1), Arginil aminopeptidasa o aminopeptidasa B (EC 3.4.11.6) (ambas solubles) y Aspartil aminopeptidasa o aminopeptidasa A (EC 3.4.11.7).

Grupos de experimentación

- Muestras cerebrales humanas postmortem de individuos adictos a opiáceos.
- Muestras cerebrales humanas postmortem de individuos control

Las muestras de origen humano se obtuvieron de autopsias judiciales realizadas en el Instituto Anatómico Forense de Bilbao por médicos forenses de los Juzgados de Bilbao, Barakaldo y Durango. En todos los casos se realizó un estudio médico-legal para conocer la posible presencia de tóxicos en sangre y fueron cedidas por el Dr. Javier Meana, profesor titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología.

Preparación de las muestras de homogenados

En cerebros humanos disponemos de muestras corticales y de núcleo caudado.

Posteriormente se procede a la homogeneización de las muestras en un tampón Tris 10mM a pH 7,4 durante 30 segundos a 800 r.p.m. Tras la homogeneización, las muestras se ultracentrifugan a 100.000 g durante 35 minutos obteniendo del sobrenadante resultante la fracción soluble. La pastilla obtenida se limpia con Tris 10 mM y a continuación se resuspende y se homogeniza de nuevo en tampón Tris 10 mM con un 1% de Tritón X-100 a pH 7,4 durante 30 segundos a 800 r.p.m. A continuación se ultracentrifuga a 100.000 g durante 35 minutos obteniendo en esta ocasión del sobrenadante la fracción unida a membrana. Todos estos pasos se realizan a 4°C.

Determinación de las proteínas

Para la determinación de proteínas se utiliza el método de Bradford²² (1976) basado en la afinidad de un colorante (Coomasie azul brillante) por las proteínas. Se mide la absorbancia a 595 nm en un fotómetro.

Determinación de la actividad enzimática

Para la determinación de las actividades aminopeptidásicas se emplea el método descrito por Greenberg²³ con las posteriores modificaciones realizadas por Alba y cols.²⁴. Para la determinación de las actividades peptidásicas se utilizan sustratos fluorogénicos. En el caso de las aminopeptidasas se emplea el sustrato alanina-beta-naftilamida, piroglutamil-b-naftilamida, aspartil-b-naftilamida, leucina-b-naftilamida, arginil-b-naftilamida, Z-Gly-Pro-b-naftilamida. Asimismo, para la determinación de la aminopeptidasa M se utiliza un inhibidor específico, la puromicina.

Al incubar el sustrato artificial con la muestra cerebral, las peptidasas presentes hidrolizan el sustrato liberando el compuesto fluorogénico que se medirá fluorimétricamente a 345 nm de excitación y 412 nm de emisión en el caso del sustratos de las aminopeptidasas,

Una vez determinada la actividad enzimática y la cantidad de proteína presente en las muestras, los resultados se expresan en unidades de aminopeptidasa por miligramo de proteína (UAP/ mg prot), siendo una UAP la cantidad de enzima que hidroliza un picomol de sustrato-b-naftilamida por minuto.

Método estadístico

Tanto en el caso de la actividad enzimática como en la determinación de proteínas los valores obtenidos se interpolarán en sus curvas patrón correspondientes. Posteriormente se comparan los adictos con sus controles mediante una T de Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las determinaciones de las actividades enzimáticas realizadas en muestras de corteza cerebral y núcleo caudado de humanos adictos a opiáceos y sus controles correspondientes. En las tablas 1 a 11 se ilustran las medias de las actividades enzimáticas (UAP/ mg prot.) con los errores estándar y el índice de significación (comparación adicto/ control) calculado mediante una T de Student.

1. ALANINA AMINOPEPTIDASA

1.1. Fracción soluble

En la tabla 1 se puede ver que la actividad ala-AP soluble es parecida en las cortezas de los adictos a opiáceos y en los individuos control (del orden de las 30.000 UAP/ mg prot). Sin embargo, existen diferencias significativas ($P < 0.039$) en los núcleos caudados de ambos grupos. La existencia de una menor actividad en los adictos (29.565 UAP/ mg prot) frente a los controles (37.132 UAP/ mg prot) nos puede sugerir que exista alguna alteración en el metabolismo de opiáceos endógenos en personas con dependencia opiácea.

Tabla 1

ALANINA AMINOPEPTIDASA FRACCIÓN SOLUBLE					
	ADICTOS		CONTROL		P
	Media	Error	Media	Error	
CORTEZA	29.994	1.624	30.262	1.534	< 0,45
CAUDADO	29.565	2.609	37.132	2.510	<0,039

1.2. Fracción unida a membrana

En las tablas 2 y 3 se representan las actividades de la ala-AP sensible a la inhibición por puromicina (MII) y la insensible a puromicina (AP M). En todos los casos se observan actividades parecidas entre adictos y grupos control. Aunque en el caso de la AP MII podemos observar que se repiten diferencias a nivel de núcleo caudado no son lo suficientemente significativas ($P < 0.07$) por lo que no podemos hablar de cambios en la actividad degradadora de encefalinas en la dependencia a opiáceos.

Tabla 2

ALANINA AMINOPEPTIDASA FRACCIÓN DE MEMBRANA PUROMICINA SENSIBLE (AP MID)					
	ADICTOS		CONTROL		
	Media	Error	Media	Error	P
CORTEZA	7.049	694	7.458	409	< 0,3
CAUDADO	6.633	481	8.565	1.159	< 0,07

Tabla 3

ALANINA AMINOPEPTIDASA FRACCIÓN DE MEMBRANA (AP M) PUROMICINA INSENSIBLE (AP M)					
	ADICTOS		CONTROL		
	Media	Error	Media	Error	P
CORTEZA	1.926	169	1.993	80	< 0,36
CAUDADO	1.749	194	1.683	148	< 0,4

2. PROLIL ENDOPEPTIDASA

2.1. Fracción soluble

La tabla 4 nos muestra que los valores de la actividad proil endopeptidasa (PE) en las cortezas de adictos y controles son muy parecidos, sin embargo a nivel de caudados las diferencias se muestran significativas ($P < 0.004$), siendo de nuevo superiores los niveles de actividad en los individuos control (10.294 UAP/ mg prot. frente a 7.565 UAP/ mg prot). Estos últimos datos nos indican que pueda haber alguna alteración en la degradación enzimática de péptidos cerebrales como la TRH, etc. en humanos con problemas de dependencia a sustancias opiáceas.

Las diferencias notables de actividad PE soluble que se observan entre las cortezas y los caudados, tanto en los controles como en los adictos han sido y están siendo objeto de estudio en nuestro laboratorio. Aunque no se corresponda con el tema que nos atañe podemos afirmar que estas diferencias entre la corteza y otras regiones del SNC evolutivamente anteriores (caudado, hipotálamo, cerebelo, etc.) son mucho mayores en el humano que las descritas en ratas (enviado como comunicación al último Congreso de La Sociedad Española de Neurociencia, celebrado en Murcia).

Tabla 4

PROLIL ENDOPEPTIDASA FRACCIÓN SOLUBLE					
	ADICTOS		CONTROL		
	Media	Error	Media	Error	P
CORTEZA	16.489	925	17.917	606	0,11
CAUDADO	7.565	426	10.294	639	0,004

2.2 Fracción unida a membrana

En la tabla 5 se presentan los resultados de la prolil endopeptidasa en su fracción unida a membrana. Las diferencias existentes entre los grupos de adictos y los controles no han sido significativas ($P < 0.18$ en córtex y $P < 0.11$ en caudados) por lo que no parece observarse cambios de esta actividad en fenómenos de adicción a opiáceos.

Tabla 5

PROLIL ENDOPEPTIDASA FRACCIÓN DE MEMBRANA					
	ADICTOS		CONTROL		
	Media	Error	Media	Error	P
CORTEZA	1.677	72	1.789	97	0,18
CAUDADO	828	73	1.048	160	0,11

3. ARGININA AMINOPEPTIDASA SOLUBLE

En la tabla 6 podemos ver la actividad de este enzima que se encuentra a nivel de la fracción soluble. En las cortezas de los casos a estudio no se ven diferencias significativas ($P < 0.15$) pero no ocurre lo mismo en los caudados. En esta región cerebral vemos una mayor actividad en los individuos control (24.408 UAP/ mg prot) frente a los adictos (19.215 UAP/ mg prot) siendo estas diferencias significativas ($P < 0.01$). Estos resultados también nos orientan hacia la existencia de cambios en actividad degradadora de otros oligopéptidos.

Tabla 6

ARGININA AMINOPEPTIDASA FRACCIÓN SOLUBLE					
	ADICTOS		CONTROL		
	Media	Error	Media	Error	P
CORTEZA	18.421	829	20.258	1.536	0,15
CAUDADO	19.215	1.383	24.408	1.295	0,01

4. PIROGLUTAMIL AMINOPEPTIDASA I

4.1. Fracción soluble

En la tabla 7 se representa esta actividad enzimática que como se puede ver es muy inferior a las anteriores (por debajo de las 200 UAP). Los valores demuestran pocas diferencias de esta actividad piroglu-AP I soluble en los distintos grupos ($P < 0.2$ y $P < 0.46$)

Tabla 7

PIROGLUTAMIL AMINOPEPTIDASA I FRACCIÓN SOLUBLE					
	ADICTOS		CONTROL		
	Media	Error	Media	Error	P
CORTEZA	132	20,3	112	9,1	0,2
CAUDADO	69	3,2	67	21,5	0,46

4.2. Fracción unida a membrana

La actividad piroglutamil aminopeptidasa I de membrana representada en la tabla 8 nos vuelve a demostrar que la actividad de este enzima varía poco en situaciones de dependencia a opiáceos ($P < 0.39$ y $P < 0.33$).

5. LEUCINA AMINOPEPTIDASA

La tabla 9 nos muestra la actividad de este enzima presente únicamente en la fracción soluble y vemos que es inferior a la de los otros enzimas des-

critos (no llega a las 600 UAP) exceptuando la actividad piroglu-AP y la asp-AP. Sin embargo, se trata de la única AP de nuestro estudio en la que a nivel cortical presenta diferencias muy significativas ($P < 0.001$) entre adictos y controles, siendo mayor en los casos de dependencia a opiáceos (581 UAP/mg prot.) que en sus controles (392 UAP/mg prot.). Esto nos sugiere que el metabolismo de algunos oligopéptidos surgidos de la hidrólisis de proteínas pueda sufrir alguna alteración en la dependencia a opiáceos.

A nivel de núcleo caudado no se han visto cambios significativos entre adictos y sus controles ($P < 0.48$).

Tabla 8

PIROGLUTAMIL AMINOPEPTIDASA I FRACCIÓN DE MEMBRANA					
	ADICTOS		CONTROL		
	Media	Error	Media	Error	P
CORTEZA	189	17,5	131	11,2	0,39
CAUDADO	183	11,2	137	6,7	0,33

Tabla 9

LEUCINA AMINOPEPTIDASA FRACCIÓN SOLUBLE					
	ADICTOS		CONTROL		
	Media	Error	Media	Error	P
CORTEZA	581	60,8	392	39,5	0,001
CAUDADO	399	24,7	390	45,7	0,48

6. ASPARTIL AMINOPEPTIDASA

6.1 Fracción soluble

La tabla 10 corresponde a la actividad soluble de un enzima que degrada péptidos en cuyo extremo amino se encuentren aminoácidos ácidos (Aspartato y Glutamato). Las diferencias que encontramos entre adictos y controles no

son significativas ($P < 0.18$ en córtex y $P < 0.4$ en caudados) por lo que no sugieren ninguna alteración de esta actividad en la dependencia a opiáceos.

Tabla 10

ASPARTIL AMINOPEPTIDASA FRACCIÓN SOLUBLE					
	ADICTOS		CONTROL		
	Media	Error	Media	Error	P
CORTEZA	145	21,7	95	16,7	0,18
CAUDADO	119	18,3	90	19,5	0,41

6.2. Fracción unida a membrana

Los valores de la actividad aspartil-Ap unida a membrana son casi el doble mayores que en soluble como demuestra la tabla 11. Sin embargo, las diferencias existentes entre adictos y controles no son significativas ($P < 0.25$ en corteza y $P < 0.11$ en caudado) por lo que podría deducirse que la aspartil-AP no sufre cambios considerables en el fenómeno de dependencia a opiáceos.

En resumen, podemos decir que en la corteza cerebral de individuos con dependencia a opiáceos no se observan actividades aminopeptidásicas diferentes a sus controles correspondientes. La única excepción se ve en la Leucina aminopeptidasa, en la que las diferencias se muestran muy significativas.

Sin embargo, en el núcleo caudado, que junto con el putamen conforma el cuerpo estriado (centro sináptico superior, a nivel subcortical, del sistema motor extrapiramidal), se pueden apreciar diferencias de actividad peptidásica significativas:

La Alanina aminopeptidasa soluble (que degrada encefalinas), la Prolil endopeptidasa soluble (degradadora de TRH, LHRH, vasopresina, oxitocina, etc.) y la Arginina aminopeptidasa (que degrada oligopéptidos de dos, tres o a veces cuatro aminoácidos y con residuos arginil y lisil) de caudados de humanos con dependencia a opiáceos presentan valores de actividad inferiores a los individuos control.

En una segunda fase se estudiarán estas actividades en modelos animales para ver si se mantienen las diferencias descritas en humanos o aparece otro comportamiento. Además en los modelos animales nos será posible estudiar el fenómeno del síndrome de abstinencia a opiáceos y los cambios que ello provoque en los enzimas a estudio.

Tabla 11

ASPARTIL AMINOPEPTIDASA FRACCIÓN DE MEMBRANA					
	ADICTOS		CONTROL		
	Media	Error	Media	Error	P
CORTEZA	290	35,3	188	12,8	0,25
CAUDADO	318	56,9	232	6,7	0,11

BIBLIOGRAFÍA

1. SNYDER S.H; (1992). "Drogas y cerebro".
2. ESCOHOTADO A; "Historia general de las drogas". (1999). (Espasa y Forum).
3. PERT, C.B. y S.H SNYDER. "Opiate receptor: demonstration in nervous tissue". (1973). Science, 179: 1011-1014.
4. SIMON, E.J., J.M MILLER y I EDELMAN. "Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ³Hetorphine to rat brain homogenate". (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 70: 1947-1949.
5. TERENIUS, L. "Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat brain cortex". (1973). Acta Pharmacol. Toxicol., 32: 629-634.
6. LORD, J.A, A.A WATERFIELD, J. HUGHES, y H.W. KOSTERLITZ. "Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors". (1977). Nature, 267: 495-499.
7. PICATOSTE, F., SARRI, E. y CLARO, E. Proteínas G y sistema adenili ciclasa. En "Monografías de Neurociencias (7): Receptores para Neurotransmisores". (1996). Ediciones en Neurociencias, JA García-Sevilla Ed., Barcelona.
8. HUGHES, J., T.W. SMITH, H.W. KOSTERLITZ, L.A. FOTHERGILL, B.A. MORGAN y H.R. MORRIS. "Identification of two related pentapeptides from the rat brain membranes with potent opiate agonist activity". (1975). Nature, 258: 577-579.
9. LESLIE, F.M. "Methods used for the study of opioid receptors". (1987). Pharmacol. Rev., 39: 197-243.
10. O'CUINN G.; "Peptide Metabolism in Cytoplasm of Brain cells". (1997). Biochemical Society Transactions, 26: 279-292.
11. LORENZO P., LADERO J.M., LEZA J.C., LIZASOAIN I.; "Drogodependencias". (1999). (Edición Panamericana).
12. AGHAJANIAN G.K. "Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and supression of withdrawal response by clonidine". (1978). Nature; 276: 186-188.
13. NESTLER EJ, AGHAJANIAN GK. "Molecular and celular basis of addiction". (1997). Science. 278: 58-63.

14. GOLD MS, REDMOND JR DE, KLEBER HD. "Clonidine blocks acute opiate-withdrawal symptoms". (1978). *Lancet*; ii: 599-602.
15. NESTLER EJ. "Molecular mechanisms of drug addiction". (1992). *JNeurosci*. 12: 2439-2450.
16. UHL, GR., RYAN, JP., SCHWARTZ, JP. "Morphine alters preproenkephalin gene expression" (1988). *Brain Res Sep 6 459:2 391-7*.
17. ROMUALDI P, IESA G, FERRI S. "Chronic opiate agonists down-regulate prodynorphin gene expression in rat brain". (1991). *Brain Res. Nov 1 563:1-2 132-6*.
18. BASHEER, R., TEMPEL, A, "Morphine-induced reciprocal alterations in G alpha s and opioid peptide mRNA levels in discrete brain regions". (1993). *J Neurosci Res. 36:5, 551-7*.
19. BERGSTRÖM, L., TERENIUS, L., "Enkephalin levels decrease in rat striatum during morphine abstinence". (1979).*Eur J Pharmacol. Dec 20 60:4 349-52*.
20. TRUJILLO, KA, BRONSTEIN, DM, SANCHEZ, IO., AKIL, H "Effects of chronic opiate and opioid antagonist treatment on striatal opioid peptides". (1991). *Brain Res. 698:1-2 69-78*.
21. FOURNIÉ-ZALUSKI MC, CORIC P, TURCAUD S, LUCAS E, NOBLE F, MALDONADO R, ROQUES BP. "'Mixed inhibitor-prodrug' as a new approach toward systemically active inhibitors of enkephalin-degrading enzymes". (1992). *J Med Chem. 25: 2473-81*.
22. BRADFORD MM. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram pf protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem. 72: 248-254*.
23. GREENBERG LJ. (1962): Fluorimetric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in order to 10-14 mole. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 9: 430-435*.
24. ALBA F.; IRIBAR C.; RAMIREZ M AND ARENAS C. (1989): A fluorimetric method for determination of brain aminopeptidases. *Arch. Neurobiol. 52; 169-173*.