

Rev. Soc. Esp. Dolor
3: 431-444, 1996

Biología molecular de los receptores opioides

A. Barrallo, R. González-Sarmiento* y R. E. Rodríguez

Barrallo A, González-Sarmiento R, Rodríguez RE. Molecular biology of opioid receptors. Rev Soc Esp Dolor. 1996;3:431-444.

SUMMARY

The analgesic effects of opium derived substances has been known since old times. The existence of opiate peptides in the nervous system was discovered in 1975. Posteriorly, pharmacological studies defined a series of opiate receptors to mediate their effect. Currently, these receptors are classified in three families: μ , δ and κ depending upon their affinity for different agonists. The exact structure of the receptors was not known until 1992 when the δ opiate mouse receptor was cloned. Shortly thereafter, the κ and μ opiate receptors were cloned in both mice and humans. Like many other neuropeptides and hormones, all of them are protein membranes with seven transmembrane segments. Currently, the mechanism which determines the ligand/receptor specificity and the molecular origin of the different receptor subtypes pharmacologically determined are being actively studied. Although initially it was thought that the expression of these genes was limited to the nervous system, at present there is growing evidence that this gene expression exists outside of it. Their presence at other sites including the immune system would explain the wide variety of peripheral effects of these substances.

Key words: Opiate receptor. μ , δ , κ . Immune system.

RESUMEN

Los efectos analgésicos de las sustancias derivadas del opio se conocen desde tiempos muy remotos. En 1975 se descubrió la existencia de péptidos opioides en el sistema nervioso. Posteriormente, mediante estudios farmacológicos se definieron una serie de receptores opioides que median estos efectos y que hoy se clasifican en tres fami-

lias: μ , δ y κ , en función de su diferente afinidad por distintos agonistas. La elucidación de su estructura no se logró hasta el año 1992, cuando se clonó el receptor opioide δ de ratón y, poco tiempo después, los receptores opioides κ y μ , tanto en ratón como en humanos. Todos ellos son proteínas de membrana con siete segmentos transmembrana, como otros muchos receptores de neuropéptidos y hormonas. Actualmente se está tratando de esclarecer el mecanismo que determina la especificidad de unión entre ligando y receptor, así como el origen molecular de los distintos subtipos que se han definido en virtud de criterios farmacológicos. Aunque inicialmente se pensaba que la expresión de estos genes estaba limitada al sistema nervioso, hay crecientes pruebas de que también se produce fuera de él, incluyendo el sistema inmune, lo que permitiría explicar el variado número de efectos periféricos que presentan estas sustancias.

Palabras clave: Receptor opioide. μ , δ , κ . Sistema inmune.

INDICE

- I. INTRODUCCION
- II. RECEPTORES OPIOIDES
- III. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS RECEPTORES OPIOIDES
- IV. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES OPIOIDES
- V. ORGANIZACION GENOMICA DE LOS RECEPTORES OPIOIDES
- VI. EXPRESION GENICA DE LOS RECEPTORES OPIOIDES
- VII. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

Opiáceos

Las sustancias derivadas de la planta del opio o adormidera (*Papaver somniferum*) y sus efectos analgésicos se conocen desde tiempos muy remotos. La primera

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

*Unidad de Genética Molecular.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. Salamanca.

Recibido: 25-V-96.

Aceptado: 10-VI-96.

referencia escrita del uso de opio se remonta a *La Odisea*, en la que Homero describe cómo Helena sirve un brebaje que contiene opio (*nephente*) a Telémaco y sus compañeros para aliviarles las fatigas de su viaje. A pesar de las dificultades que surgen al interpretar textos antiguos y datos arqueológicos, parece evidente el uso del opio en la civilización sumeria en el tercer milenio a. C. y su extensión a las culturas con las que los sumerios entraron en contacto. Aunque el opio se empleó inicialmente como euforizante en el transcurso de ritos religiosos, su uso se amplió posteriormente al ámbito de la medicina primitiva, utilizándose para realizar operaciones quirúrgicas y como sedante para los moribundos; en el papiro de Ebers (1500 a. C.) se detalla un remedio para calmar el llanto de los niños que incluye el opio en su composición (1).

En el siglo VIII los comerciantes árabes introdujeron el opio en India y China y a partir de los siglos XI y XII el opio irrumpe en Europa, donde su uso medicinal es popularizado por Paracelso y pronto se supo que la utilización de estos compuestos genera el problema de la adicción a los mismos (1).

En 1806 Sertürner aisló la sustancia activa del opio a la que denominó morfina en honor a Morfeo, dios griego del sueño. La morfina pura se empezó a producir en grandes cantidades y ya en 1850 se empezó a utilizar por vía parenteral en el tratamiento del dolor crónico así como anestésico en cirugía, ya que disminuía la cantidad de cloroformo necesaria para inducir anestesia. Desafortunadamente, la morfina poseía el mismo potencial adictivo que el opio, por lo que se dedicaron grandes esfuerzos a desarrollar nuevos opiáceos que fuesen más eficaces y menos adictivos.

En la década de los sesenta los investigadores habían llegado a la conclusión de que las complejas interacciones entre las drogas de tipo morfina, sus antagonistas y los agonistas-antagonistas mixtos podían explicarse mejor postulando la existencia de más de un tipo de receptor para los opiáceos y drogas afines y Goldstein y cols propusieron que la utilización de drogas marcadas radiactivamente permitiría caracterizar estos receptores (2). Aunque sus esfuerzos en la identificación de los receptores fueron vanos ante la imposibilidad de generar radioligandos con actividades específicas, sus estudios permitieron que los grupos de Pert (3), Simon (4) y Terenius (5) demostraran casi simultáneamente la existencia de sitios de unión estereoespecíficos saturables para drogas opiáceas en el sistema nervioso central (SNC), si bien estos sitios no tenían una distribución homogénea (6).

Estas investigaciones llevaron a concluir, que los opiáceos actúan como agonistas interactuando con sitios de unión o receptores estereoespecíficos y satura-

bles en el encéfalo y en otros tejidos. Hoy se acepta como evidente que los opiáceos ejercen diversos efectos como, por ejemplo, analgesia, somnolencia, disforia, depresión respiratoria, disminución de la motilidad intestinal, náuseas, vómitos, alteraciones del sistema endocrino, etc.

Péptidos opioides

Una vez demostrada la existencia de receptores para los opiáceos, se dedujo que su existencia en el SNC debía estar relacionada con la existencia de ligandos endógenos. En 1975 Kosterlitz y Waterfield observaron, estudiando extractos de cerebro de cerdo, que éstos contenían un factor que inhibía la liberación de acetilcolina de los nervios que inervan el intestino delgado y que este efecto era bloqueado por la naloxona (7). En 1975 Hughes y colaboradores aislaron y caracterizaron dos pentapéptidos con actividad opioide del cerebro de cerdo (8). Estos péptidos, que difieren únicamente en el aminoácido C-terminal, fueron denominados Metionina-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) y Leucina-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). Pronto resultó evidente que la Met-encefalina estaba presente en el extremo amino terminal de otra molécula, la β -endorfina, que era un fragmento de la β -lipotropina, aislada varios años antes de extractos de hipófisis (9). Al igual que las encefalinas, la β -endorfina tenía gran afinidad por los receptores opioides cerebrales.

Se ha comprobado que todos los péptidos opioides identificados hasta el momento provienen de la fragmentación de tres precursores polipeptídicos de mayor tamaño: la pro-encefalina (10), de la que derivan, entre otros, la Met-encefalina y la Leu-encefalina, péptidos E y F; la pro-dinorfina (11), que origina las α y β -neendorfinas y las dinorfinas A y B; y la pro-opiomelanocortina (12), de la que surge la β -endorfina. La existencia de tantos ligandos naturales en el sistema nervioso, así como de variados compuestos agonistas, antagonistas y agonistas-antagonistas mixtos para cada uno de ellos, sugería que no debía haber un sólo receptor opioide sino varios.

II. RECEPTORES OPIOIDES

La existencia del receptor opioide se postuló por primera vez en base a los resultados obtenidos en estudios de analgesia realizados tanto a nivel de animal de experimentación como a nivel clínico. En 1967 Martin sugirió que la analgesia provocada por las drogas de tipo morfínico podría explicarse si se consideraba la posible existencia de más de un tipo de receptor

opioide (13). Posteriormente, el análisis y desarrollo de técnicas experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, ha permitido confirmar la existencia de más de un tipo de receptor con funciones independientes, aunque algunos investigadores sugieren la posible existencia de interacción alostérica entre ellos (14). La variabilidad de los resultados obtenidos en los estudios de afinidad por un ligando concreto puede ser atribuida a las distintas formas de interacción de un ligando específico con un receptor (15) o a la posible existencia de más de un tipo de receptor en un mismo tejido (16) o incluso en una misma célula (17).

Los estudios farmacológicos realizados durante los últimos años han puesto de manifiesto la existencia de diferentes subtipos de receptores que se han agrupado en tres familias, mu (μ), delta (δ), y kappa (κ), de acuerdo con la afinidad de diferentes sustancias opioideas (18), con su distribución anatómica (19, 20) y las diferencias en actividad antagonista con la que actúa la naloxona (antagonista del receptor opioide) sobre los tres tipos de receptores (21).

El receptor opioide δ presenta una baja afinidad por el ligando endógeno dinorfina. Sin embargo, este receptor tiene una alta afinidad por la encefalina, lo que sugiere que la encefalina es un ligando endógeno de este receptor. Es más, estudios anatómicos han mostrado una coexpresión de encefalina y receptor opioide δ en varias regiones del SNC (22). Por otra parte, mientras que la dinorfina A (1-13) exhibe una potente actividad sobre el receptor κ , la encefalina tienen una baja afinidad por este receptor, lo que sugiere que la dinorfina puede ser el transmisor endógeno que actúa sobre el receptor κ . El receptor opioide μ presenta una alta afinidad por la encefalina. Además, la distribución tisular de encefalina y de mRNA del receptor μ presenta una gran correlación (22, 23), lo que sugiere que la encefalina puede interaccionar con el receptor μ en condiciones fisiológicas. Finalmente, la beta-endorfina se une potentemente tanto al receptor δ como al μ , pero exhibe una afinidad menor en el receptor κ , lo que plantea la posibilidad de que en tejidos periféricos, donde la endorfina es más abundante que la encefalina o la dinorfina, la beta-endorfina sea el ligando endógeno para los receptores δ y μ .

Uno de los problemas más difíciles que han surgido al interpretar la función analgésica de los receptores opioideos en el SNC de mamíferos ha sido la ausencia de ligandos específicos. Sin embargo, recientemente se han logrado sintetizar análogos selectivos de los opioideos endógenos para cada uno de los subtipos receptoriales. Entre estos nuevos opioideos sintéticos podemos citar el DAMGO, que es un análogo de las encefalinas con estructura: D-Ala²-NMe Phe⁴-Glyol⁵-

encefalina y actúa como un agonista μ altamente selectivo (24, 25). El DPDPE, un agonista δ -selectivo cuya estructura está formada por la unión cíclica de dos penicilaminas: D-Pen²-D-Pen⁵-encefalina (26, 27), y el U-69593, que es un análogo del agente κ selectivo U-50488H (28), cuya estructura química se describe como: (5a,7a,8b)-(-)-N-metil-N-[7-(1-pirrolidinil)-1-oxaspiro(4,5) dec-8-il] benzeno acetamida (29) y que es considerado un agonista selectivo κ .

La utilización de estos análogos selectivos ha permitido demostrar que los tres tipos de receptores opioideos presentan propiedades farmacológicas distintas que pueden ser diferenciadas con claridad (30-34). Los receptores opioideos δ tienen una alta afinidad por los agonistas DPDPE, DSLET, deltorfina II y por el antagonista nartrindol, compuestos que se unen con menor afinidad a los receptores κ y μ . Además, de acuerdo con estudios farmacológicos y de comportamiento, se ha propuesto la existencia de subtipos del receptor δ (33, 35): el receptor δ_1 es activado selectivamente por la DPDPE y bloqueado por el antagonista BNTX; el receptor δ_2 es activado selectivamente por la deltorfina II y bloqueado por el antagonista NTB. Además, ambos subtipos son activados por las encefalinas y por la beta-endorfina y bloqueados con alta afinidad por el antagonista naltrindol. Estudios de comportamiento analgésico han mostrado que la analgesia inducida por DPDPE es bloqueada por BNTX pero no es bloqueada por NTB (36). También se ha podido comprobar que la administración de DPDPE produce tolerancia y que se puede evitar administrando BNTX pero no NTB. La deltorfina II también puede producir tolerancia, que es bloqueada por NTB pero no por BNTX (37). No se ha observado tolerancia cruzada entre la deltorfina II y la DPDPE. A pesar de estos hallazgos, que indican que a nivel farmacológico existen subtipos de receptores delta, hasta el momento actual no se ha podido confirmar la existencia real de distintos subtipos del receptor opioide δ ni a nivel de unión al receptor, ni a nivel bioquímico.

El receptor opioide κ exhibe una alta afinidad por los agonistas U50,488 y U69,593 y por el antagonista nor-BNI (31). Los agonistas U50,488 y U69,593 no se unen a los receptores δ o μ y el antagonista nor-BNI es menos potente sobre los receptores δ y μ que sobre el receptor κ . Diversos investigadores, basándose en estudios farmacológicos (39), han sugerido la posible existencia de tres subtipos de receptores κ . Sin embargo, aún no se han producido compuestos κ -selectivos que puedan definir la existencia de subtipos farmacológicos para este receptor.

Por su parte, los receptores μ presentan una alta afinidad por el agonista peptídico DAMGO, por la mor-

fina y sus derivados, y por los antagonistas CTOP y naloxonacina (39). DAMGO y CTOP no se unen al receptor opioide κ , ni tampoco al receptor delta. La morfina sin embargo, sí se une a los receptores δ y κ , aunque con afinidad baja. También se ha sugerido, tras estudios farmacológicos, la existencia de subtipos de receptores μ (40) (μ_1 y μ_2 , sobre el que supuestamente debe actuar la morfina) pero, al igual que en el caso de los receptores κ , aún no existen compuestos selectivos que puedan ayudar en la tarea de diferenciación entre los posibles subtipos farmacológicos del receptor opioide μ .

La reciente caracterización molecular de los genes de los distintos receptores opioides ha facilitado aún más el estudio sobre la función de los distintos receptores, tanto a nivel central como a nivel periférico. Cada receptor puede ser expresado en una línea celular diferente y sus características farmacológicas, bioquímicas y fisiológicas pueden ser estudiadas de forma independiente.

III. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS RECEPTORES OPIOIDES

Los primeros intentos para caracterizar molecularmente los receptores opioides fueron infructuosos. Los intentos de purificar la proteína se vieron impedidos por la dificultad para solubilizarla de la membrana de forma que retuviera su capacidad de unir los ligandos específicos. Además, la capacidad de unión ligando-receptor se veía seriamente afectada por los detergentes empleados habitualmente para solubilizar proteínas de membrana. En una segunda aproximación, se utilizaron ligandos marcados radioactivamente que se unían covalentemente al receptor y permitían su purificación, método que permitía la utilización de detergentes aún siendo estos desnaturizantes. Por otra parte, la cantidad de receptores opioides presentes en los tejidos estudiados era pequeña en comparación con otros componentes presentes en las mismas células, lo que representaba una dificultad adicional. Aún así, se lograron purificar parcialmente y reconstituir en membranas modelo tipo vesícula algunas proteínas con capacidad de unión de opioides, aunque con grandes divergencias en cuanto a su peso molecular (de 35 a 94 KDa) (41). Los intentos que se hicieron para, a partir de estas proteínas, secuenciar un polipéptido con el fin de obtener un oligonucleótido que pudiera ser utilizado en el análisis de una genoteca, no resultaron eficaces ya que los péptidos resultaron muy cortos y sus secuencias nucleotídicas marcadamente degeneradas como para poder ser usadas como sonda. El único caso en el que este procedimien-

to tuvo éxito y se consiguió aislar un cDNA, éste codificaba una proteína con homología con la superfamilia de las inmunoglobulinas y las moléculas de adhesión celular. Al realizar estudios de transfección con este cDNA, se comprobó que no confería propiedades de unión de opioides a las células que lo expresaban de manera exógena (42).

Así pues, durante años se siguió especulando sobre la naturaleza de estos receptores y sobre la posibilidad de que los tres tipos definidos se correspondieran con los productos de tres genes diferentes, fueran productos del procesamiento alternativo de un único gen con diferentes exones o se tratara de una única proteína que se modifica bien post-traduccionalmente o bien mediante interacciones con otros componentes específicos.

Paralelamente a la purificación de la proteína, se intentó la clonación del gen o genes que codificaban para los receptores opioides. La forma más directa de conseguir este objetivo era el rastreo de una genoteca de expresión, para lo cual se utilizaron tres aproximaciones:

- a) La utilización de anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos, es decir, anticuerpos generados contra la región variable de otro anticuerpo dirigido contra un ligando específico del receptor. Los intentos realizados en este sentido no tuvieron éxito (43, 44). Se encontraron demasiados falsos positivos debido en parte a que este método sólo es útil cuando el mRNA buscado es relativamente abundante en el tejido del que se parte para preparar la genoteca, y éste no es el caso de los receptores opioides.
- b) La detección electrofisiológica. Técnica extremadamente sensible y que se basa en la capacidad de los oocitos de *Xenopus* de acoplar receptores exógenos con sus propios mecanismos de transducción de la señal. Transfectando estas células con un mRNA apropiado se puede estudiar posteriormente si la administración de ligandos opioides generaba una movilización del Ca^{+2} celular o se abrían los canales de Cl^- . También este sistema resultó infructuoso.
- c) El uso de ligandos marcados radioactivamente (principalmente con ^{125}I). Mediante este método, a finales de 1992 dos grupos lograron clonar simultáneamente el primer receptor opioide (45, 46). Para ello, ambos grupos partieron del cDNA de la línea celular murina NG108-15 (neuroblastoma-glioma) que expresa el receptor δ en relativa abundancia, y lo clonaron en plásmidos de expresión con los que se creó una genoteca en *Escherichia coli*. Estos plásmidos, divididos en

fracciones, se transfectoron a células COS en las que se analizó la unión de un péptido específico para el receptor δ marcado radioactivamente. La fracción que proporcionó una mayor unión se subfraccionó y se volvió a analizar de la misma manera. Este proceso fue repetido hasta obtener un clon puro cuyo cDNA fue secuenciado, confirmando que la proteína que codificaba presentaba las características de unión de ligandos del receptor δ .

A partir de 1992, diferentes grupos, aplicando técnicas de biología molecular y basándose en una posible homología entre los distintos receptores, han clonado cDNAs que codifican diferentes receptores opioides. El cDNA del receptor opioide κ se aisló por casualidad mientras se rastreaba una genoteca en busca de subtipos del receptor de la somatostatina. Los resultados de estos estudios, realizados principalmente en ratón y en rata, aunque también se han clonado los correspondientes humanos, han revelado la existencia de tres genes diferentes que efectivamente muestran una gran homología entre sí y con otros miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G tales como somatostatina, angiotensina II, neuromedina, rodopsina, etc (47-65).

Recientemente se ha logrado clonar otro receptor que presenta un alto grado de homología con los tres receptores opioides y cuya expresión se localiza a nivel del SNC (66-72). La caracterización farmacológica de este nuevo receptor no corresponde con ninguno de los subtipos de los receptores ya definidos, por lo que se le denominó ORL (acrónimo del inglés *opioid receptor like*). Poco tiempo después se ha logrado purificar el ligando endógeno de este receptor, que ha resultado ser un péptido de 17 aminoácidos, semejante a los péptidos opioides, y que ha recibido el nombre de nociceptina u orfanina FQ (73, 74). Sin embargo, el efecto fisiológico producido por la nociceptina en pruebas de comportamiento analgésico (hiperalgesia) es opuesto al observado para los péptidos opioides (analgésia).

IV. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES OPIOIDES

Los receptores opioides son proteínas en cuya estructura se definen siete segmentos con elevada hidrofobicidad y conformación de α -hélice que pueden disponerse atravesando la membrana, definiendo una serie de dominios que pueden quedar en el exterior celular y otros en el interior (fig. 1), de la misma manera que muchos otros receptores de este tipo ya caracteri-

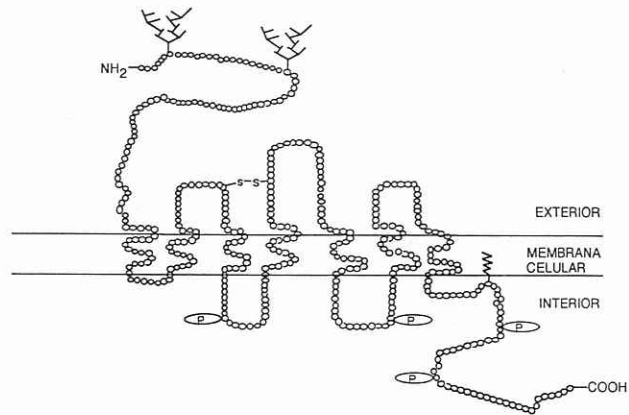


Fig. 1.— Estructura teórica de un receptor opioide modelo y su orientación en la membrana. Se muestran los siete segmentos transmembrana y los lazos que los conectan, cuya longitud depende del tipo del receptor. Las estructuras ramificadas del extremo N-terminal representan las glicosilaciones sobre residuos de Asn, su número y extensión dependen del tipo de receptor. También se representa el puente disulfuro entre los lazos extracelulares 2 y 3, los posibles puntos de fosforilación sobre Ser y Thr en el interior celular, así como la molécula de ácido graso, habitualmente palmitoleico, que contribuye a formar el cuarto lazo intracelular.

zados pertenecientes a la superfamilia de receptores que acoplan con proteínas tipo G para transducir la señal al interior celular.

El receptor opioide δ de ratón consta de 372 residuos aminoácidos que constituyen una proteína de 40,8 KDa de peso molecular (46), el tipo κ tiene 380 aminoácidos (proteína de 42,7 KDa) (51) y el tipo μ 398 aminoácidos (proteína de 44,5 KDa) (62). Estos receptores presentan diversas modificaciones post-traduccionales como son por ejemplo:

- a) N-glicosilación. Aparecen cinco sitios de glicosilación en residuos de Asparagina en el receptor μ y dos en los receptores δ y κ . Estos puntos de glicosilación se observan en el extremo N-terminal de la proteína, que se encuentra en el exterior celular, y cuyo papel en la unión del ligando no parece ser relevante.
- b) Puentes disulfuro, establecidos entre los residuos de Cys de los lazos extracelulares 2 y 3, que pueden contribuir a la fijación de la estructura tridimensional de la proteína.
- c) Secuencias consenso de fosforilación (tanto para proteína-quinasa A, dependiente de cAMP, como para proteína-quinasa C, dependiente de Ca^{+2}) sobre residuos de Ser y Thr en los lazos intracelulares, lo que posibilita su regulación mediante

mecanismos que se encuentran en otras muchas proteínas celulares y que puede estar relacionado con el desarrollo de fenómenos de tolerancia y dependencia ante ligandos opioides u opiáceos por desensibilización de los receptores.

- d) Un posible sitio de palmitoilación sobre un residuo de Cys en el extremo C-terminal de la proteína (intracelular), que puede posibilitar la formación de un cuarto lazo intracelular como ocurre en otros receptores pertenecientes a la misma superfamilia.

Al comparar las proteínas se ha observado que presentan una alta homología, siendo mayor en el segundo, tercero y séptimo dominios transmembrana, el primer lazo extracelular y el segundo, tercer y cuarto lazo citoplasmático, lo que explica que tengan características comunes a nivel de unión al ligando y que los mecanismos de transducción y regulación sean semejantes. Así mismo, se ha observado que los tres receptores opioides presentan mayor divergencia en los extremos N-terminal y carboxílico y en los lazos extracelulares 2 y 3 (50).

Dada la similitud existente entre los receptores opioides a nivel de proteína y las grandes diferencias que muestran en cuanto a sus propiedades de unión a ligandos específicos, resulta interesante estudiar en estos receptores las regiones y/o aminoácidos concretos de la proteína que son esenciales para producir la unión de ligandos específicos. La comprensión plena del mecanismo que subyace en este fenómeno permitirá diseñar compuestos, con potencial farmacológico, totalmente específicos para cada receptor. De esta forma se podría llegar a obtener productos analgésicos eficaces con los que se puedan obviar al menos los principales efectos secundarios indeseables de los derivados opiáceos utilizados en la clínica en el momento actual. Con este objetivo, se han realizado estudios mediante mutagénesis dirigida y construcción de receptores quiméricos (75-88) con los que, aunque los resultados obtenidos hasta ahora no son totalmente esclarecedores, se ha podido desarrollar una posible hipótesis para explicar la especificidad de la unión de cada ligando con su receptor (89).

Esta hipótesis parte del concepto previo de que los ligandos se dividen estructural y funcionalmente en dos elementos, uno que determina la especificidad del receptor al que se une, la *dirección*, y otro que activa al receptor para que traduzca la señal, el *mensaje* (90). Este concepto parece ajustarse al caso de los opioides puesto que existen distintos receptores que desencadenan la misma señal al activarse y diferentes ligandos peptídicos específicos para cada receptor. Así, el resi-

duo de Tyr en posición N-terminal constituye la parte de mensaje común de estos péptidos mientras que la región discriminadora sería la parte C-terminal del péptido. Estos hallazgos permiten explicar porqué el ligando del receptor ORL, la nociceptina, no tiene acción alguna sobre los receptores opioides pese a que se trata de un péptido de estructura similar a los opioides, ya que en posición N-terminal posee un residuo Phe en lugar de la Tyr que poseen los opioides.

En definitiva, estos estudios permiten suponer que el mensaje común a los péptidos opioides se uniría en la zona transmembrana de los receptores, donde estos presentan un alto grado de homología, mientras que los lazos extracelulares, diferentes entre los tipos, serían los encargados de reconocer los distintos péptidos y determinar la especificidad de la unión. Así, para ligandos específicos del receptor μ es necesario el lazo extracelular 1 (81, 86), aunque otros autores sugieren que la especificidad μ depende del tercer lazo extracelular (77). En el caso del receptor κ , la zona de discriminación parece estar en el segundo lazo extracelular (76, 78, 82). En la interacción con la proteína transductora se cree que están involucrados dos residuos Asp en los segmentos transmembrana 2 y 3 y un residuo de His en el sexto segmento transmembrana (80).

También se ha postulado que el mecanismo que confiere la especificidad de unión entre ligando y receptor es del tipo de exclusión, es decir, que los lazos extracelulares no establecen interacciones favorables con los ligandos, sino que impiden que los no específicos lleguen al sitio de unión activo (89). De acuerdo con este modelo, los ligandos específicos de un receptor son aquellos capaces de sortear las barreras que el entorno extracelular del mismo establece para acceder al sitio de unión y no son capaces de hacerlo en los otros receptores. Esto no implica que no existan también interacciones favorables que ayudan a conducir al ligando hacia el sitio activo, aunque desempeñarían un papel menor en el proceso de selección de ligandos con capacidad de unión a un receptor específico. Así mismo, esta hipótesis permitiría explicar la existencia de ligandos opioides no selectivos que se unen con igual afinidad a todos los tipos de receptores y a la diversidad de quimeras de los receptores opioides que se han construido. Estos ligandos son moléculas más rígidas que los péptidos opioides, que poseen el motivo químico característico del mensaje opioide y cuyo pequeño tamaño les permite sortear todos los impedimentos que los lazos extracelulares de los receptores de cualquier tipo oponen para llegar al centro activo del receptor.

El mecanismo de unión de los antagonistas opioides a los receptores es menos conocido. En el caso de la

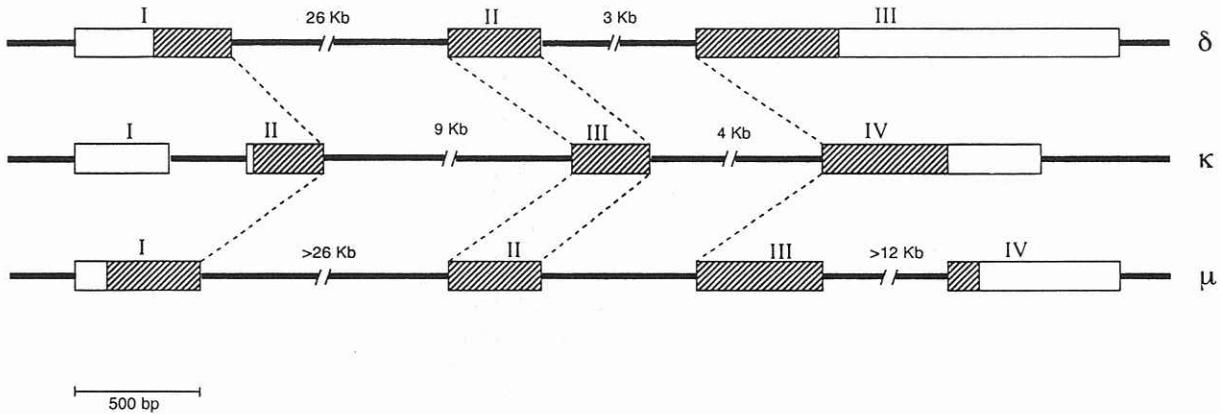


Fig. 2.— Estructura genómica de los tres receptores opioides clonados en el ratón. Los rectángulos representan los exones en que se divide cada gen. Las zonas sombreadas son las secuencias codificantes. Las líneas punteadas unen los sitios de procesamiento del mRNA que comparten los tres genes. Los tamaños indicados para los intrones son aproximados.

naloxona, su falta de especificidad sugiere que se une a la región transmembrana del receptor, muy similar en los tres tipos, pero de un modo distinto a como lo hacen los agonistas puesto que su unión no significa una activación del receptor e interacción con las proteínas G a pesar de que bloquea la acción de los agonistas (80). Aparentemente los antagonistas desencadenan un cambio conformacional distinto al que causan los agonistas, posiblemente obstruyendo el sitio de unión agonista-receptor.

V. ORGANIZACION GENOMICA DE LOS RECEPTORES OPIOIDES

Una vez demostrado que los tres receptores opioides están codificados por tres genes distintos, queda por dilucidar cómo se originan los subtipos farmacológicos en los que se clasifican estos receptores. Los experimentos de transfección con cDNAs de los distintos receptores muestran que cada receptor se corresponde únicamente con uno de los subtipos definidos farmacológicamente. El receptor κ clonado con el subtipo κ_1 , el receptor μ con μ_1 y el receptor δ con δ_2 (91). Estos resultados plantean el interrogante de si los demás subtipos están codificados por otros genes distintos o derivan de los genes que ya han sido clonados.

Estos genes están compuestos por varios exones. Como se observa en la figura 2, el receptor δ de ratón está compuesto por tres exones (92) y los receptores μ (93) y κ (94, 95) por cuatro cada uno. Esta estructura se ha conservado filogenéticamente y se mantiene en los seres humanos (96-98). Es más, las uniones exón-intrón de los dos primeros intrones coinciden en la

misma posición de la secuencia codificante en los tres receptores, tanto en el ratón como en el humano. El exón 1 codifica en todos los casos el extremo N-terminal de la proteína y el primer segmento transmembrana y el exón 2 codifica hasta el final del segundo lazo extracelular. Este hecho sugiere que los tres genes de los receptores opioides surgieron de un gen ancestral común que anteriormente había adquirido esta estructura exónica y que divergió en algún momento de la evolución de la rama común de la superfamilia de los receptores con siete segmentos transmembrana. Al analizar los tres receptores filogenéticamente, se ha calculado que los receptores μ y κ están más próximos entre sí que del receptor δ . Hasta ahora no se han encontrado otros exones complementarios alternativos para explicar el posible procesamiento diferencial del mRNA que diera lugar a la aparición de los subtipos receptoriales. Tampoco se ha podido demostrar un proceso de reordenamiento somático similar al que tiene lugar para generar la diversidad de inmunoglobulinas y receptores de células T (Rodríguez, R.E., datos no publicados).

En el ratón estos genes se encuentran en cromosomas diferentes: el receptor δ en el cromosoma 4 (99), el receptor κ en el cromosoma 1 y el receptor μ en el cromosoma 10 (100). Más tarde estos receptores fueron localizados en el genoma humano: el receptor δ en la banda 1p34 (101), el receptor μ en 6q25 (98) y el receptor κ en 8q11 (102). Así como la similitud en la estructura genómica indica claramente una relación de parentesco evolutivo entre los genes de los receptores opioides, su dispersión en el genoma de distintos organismos sugiere que estos genes resultaron afectados por alguna traslocación después de que

	H	Q	L	E	N	L	E	A	E	T	A	P	L	P		
MOR 1	CAT	CAG	CTA	GAA	AAT	CTG	GAA	GCA	GAA	ACT	GCT	CCC	TTG	CCC	TAA	CAG
		Secuencia de procesamiento														
MOR 1A	CAT	CAG	<i>GTA</i>	<i>CGC</i>	<i>AGT</i>	<i>CTC</i>	<i>TAG</i>	<i>ATT</i>	<i>TAG</i>	<i>GTA</i>						
	H	Q	V	R	S	L										

Fig. 3.— Comparación de las secuencias de DNA y de aminoácidos del extremo 3' de los receptores MOR 1 y MOR 1A; toda la secuencia a 5' no mostrada es idéntica. La secuencia del intrón se muestra en cursiva. Los codones de parada están en letra negra.

el gen ancestral del que derivan hubiera sufrido una duplicación (94).

Se han encontrado dos especies diferentes de mRNA del receptor opioide μ que codifican proteínas que difieren únicamente en la porción final del segmento C-terminal intracelular (103, 104). La posible distinción funcional respecto al receptor normal puede radicar en la transducción de la señal y/o en la localización celular. La variante humana se origina por la no eliminación del último intrón del gen en el mRNA y debido a que en la secuencia de este intrón se encuentra un codón de terminación en fase de lectura, la terminación de la traducción a proteína se produce antes y se genera un receptor cuyo extremo C-terminal es ocho aminoácidos más corto (ver figura 3). Es posible que la variante encontrada en rata se origine de un modo análogo, pues no se conoce la estructura del gen en esta especie. Se ha comprobado que no difieren de la proteína normal en cuanto a propiedades de unión de ligando, con lo cual probablemente se trate simplemente de mRNAs inmaduros que no se han terminado de procesar y que se han detectado por azar.

Una prueba más consistente a favor de la existencia genética de subtipo de receptores de opioides se ha obtenido a partir de los estudios realizados por el grupo de G.W. Pasternak usando oligonucleótidos antisentido

para el receptor μ (105). Se ha comprobado que usando oligonucleótidos contra los exones 1 y 4, pero no contra los exones 2 y 3, se bloquean los efectos mediados por el subtipo μ_1 tales como la analgesia supraespinal inducida por morfina, mientras que usando sólo oligonucleótidos contra el exón 4, se bloquean las acciones mediadas por μ_2 , como la analgesia espinal por morfina y el tránsito gastrointestinal. Es más, el uso de este oligonucleótido no bloquea los efectos desencadenados por la morfina-6 β -glucurónido, lo que sí es inhibido por los oligonucleótidos dirigidos contra los exones 2 y 3 (ver figura 4). Todo ello indicaría que el receptor μ_1 debe contener sólo los exones 1 y 4 del gen clonado, el μ_2 sólo el 4, mientras que los exones 2 y 3 formarían parte de un nuevo subtipo que mediaría la acción de este análogo derivado de la morfina, lo cual deja sin significado farmacológico al gen que se clonó y caracterizado como receptor opioide μ .

VI. EXPRESION GENICA DE LOS RECEPTORES OPIOIDES

Además de en el SNC, se ha demostrado la existencia de receptores opioides de características semejan-

5'	[1 2 3 4]										3'	MOR 1
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Oligo antisentido	
+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	μ_1	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	μ_2	
-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	M-6-G	

Fig. 4.— Los rectángulos representan los cuatro exones del receptor μ y bajo ellos, los distintos oligonucleótidos antisentido correspondientes a cada uno y el resultado de los diferentes ensayos. Un signo + significa que el oligonucleótido bloquea la actividad del receptor y un signo - implica que no hay cambios en la actividad.

tes a los receptores opioides cerebrales en fibras nerviosas sensoriales (106, 107). Por otra parte, se ha podido comprobar que los ganglios de la raíz dorsal contienen mRNA de los receptores opioides (108, 109), lo que explica que las fibras de aferencia primaria sean los responsables a nivel periférico de los efectos antinociceptivos de la morfina (110). Sin embargo, estas observaciones no aclaran el mecanismo mediante el cual se produce antinocicepción por mediación de los receptores opioides en neuronas periféricas. Los opioides aumentan el flujo de K^+ y disminuyen el flujo de Ca^{+2} en los somas de las neuronas sensoriales (111, 112) lo que puede producir la inhibición de la liberación de neurotransmisores. También se sabe que los opioides inhiben la liberación dependiente de Ca^{+2} de compuestos excitatorios proinflamatorios, como la substancia P, en terminales sensoriales periféricos (113); este hecho es importante ya que puede explicar la acción antiinflamatoria de los opioides (114).

En tejido normal, los efectos de los opioides a nivel periférico no se observan de inmediato, sino que se requieren minutos, e incluso horas desde que se inicia una reacción de inflamación hasta que se observa algún efecto, lo que sugiere la preexistencia de receptores opioides en los terminales nerviosos periféricos (108, 115). En favor de esta hipótesis está el hecho de que se han encontrado cantidades basales altas de mRNA de los receptores opioides en los nervios cutáneos de tejido normal (106, 107).

Aunque los receptores opioides están ampliamente distribuidos en el SNC, se han observado variaciones específicas en la distribución de los distintos tipos (μ , δ y κ), lo que implica la posibilidad de que existan diferencias funcionales entre los tres tipos de receptores (116). Sin embargo, la distribución de los receptores opioides en el sistema periférico no ha sido estudiada en profundidad, y aún no hay un mapa claro que permita el conocimiento y comprensión de la función que los receptores opioides pueden tener en el sistema periférico.

Estudios iniciales de la expresión de receptores opioides mediante la técnica de Northern en diversos tejidos no periféricos no demostró la presencia de transcritos de estos genes (48, 51, 64). No obstante, estudios realizados recientemente por nuestro grupo utilizando la técnica de PCR inversa, que es notablemente más sensible que la técnica de Northern, nos ha permitido detectar la expresión de estos receptores en hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino delgado, músculo, corazón y sangre periférica de ratón (117). Recientemente, Wittert y cols (118) han encontrado resultados similares al estudiar con esta técnica RNAs obtenidos de tejidos de rata. Esta amplia distribución

de los receptores opioides en tejido periférico sugiere que los péptidos opioides endógenos deben tener alguna función a nivel fisiológico.

No obstante, los resultados obtenidos por nuestro grupo y por el de Wittert, no permiten descartar que la expresión tisular de receptores opioides sea debida a contaminación por células de sangre periférica, ya que los animales no fueron perfundidos ante la necesidad de no alterar la expresión como presumiblemente ocurriría al utilizar anestesia.

La relación entre el sistema inmune y los alcaloides opiáceos como la morfina se conocen desde la segunda mitad del siglo XIX. En 1867 se describió que la morfina inhibía la actividad amebode de los granulocitos, y en la primera mitad del presente siglo se abrió un debate, aún no cerrado, sobre si la adicción al opio (morfina, heroína) incrementa la susceptibilidad a las infecciones y otras enfermedades. Años más tarde, con el descubrimiento de los péptidos opioides, se empezaron a estudiar sus posibles efectos sobre el sistema inmune y, además, se encontró que estos péptidos eran sintetizados por el mismo sistema inmune.

Durante los últimos años ha ido creciendo la evidencia experimental sobre efectos de los opiáceos exógenos en las células del sistema inmune, destacando sobre todo la depresión de la actividad de los linfocitos T. Una de las consecuencias clínicas de este efecto depresor es la mayor incidencia de infecciones en pacientes drogodependientes. Se sabe que la administración de morfina aumenta la susceptibilidad a infecciones víricas y bacterianas y que la dosis y el tiempo de administración modifican esta susceptibilidad. Así, mientras que el tratamiento crónico con opioides *in vivo* induce un estado de tolerancia inmune con resistencia a las infecciones víricas, su administración durante un periodo de tiempo corto tiene un efecto depresor del sistema inmune. Es más, en estudios clínicos se ha observado que los adictos a la heroína presentan niveles de infección elevados (119, 120). Tras estas observaciones iniciales, otros investigadores observaron que la mitogénesis linfocitaria estaba deprimida en los drogodependientes (121), y que la adicción a opiáceos produce una reducción importante en el número total de linfocitos T en sangre periférica (122).

Además, existe evidencia farmacológica que sugiere que algunas células del sistema inmune poseen receptores opioides. En relación con el receptor opioide κ , Sharp y cols, utilizando concentraciones peptídicas relativamente bajas, del orden de 10^{-4} M, describieron en 1985 que la dinorfina, péptido opioide endógeno κ -selectivo, así como la β -endorfina, aumentan la producción de superóxidos en leucocitos humanos poli-

morfonucleares y en macrófagos peritoneales (123). Además, otros autores han encontrado que la β -endorfina, la dinorfina y la met-enkefalina, tienen una función bifásica, aumentando y disminuyendo la proliferación de células T (124, 125). También Taub y cols en 1991 (126) observaron en estudios *in vitro*, que la producción de anticuerpos en esplenocitos murinos era inhibida por agonistas μ y κ -selectivos a concentraciones muy bajas (10^{-10} M), lo que sugiere que los receptores μ y κ tienen una función específica en la regulación de la producción de anticuerpos.

A pesar de estos resultados, el análisis de la relación entre el sistema opioide y el sistema inmune aún está en sus etapas iniciales. La búsqueda de sitios de unión al receptor opioide en leucocitos, ha sido difícil. Mediante técnicas de unión al receptor se ha podido determinar la existencia de receptores opioides en leucocitos humanos y murinos (127), así como en algunas líneas celulares (128). Sin embargo, estos sitios de unión no presentan todas las características farmacológicas de los receptores opioides cerebrales como, por ejemplo, la selectividad y afinidad tanto de los alcaloides como de los péptidos opioides (129). Además, los estudios que se han hecho con distintos agonistas opioides no parecen tener una correlación clara con los sitios de unión opioidea que se observan en el sistema inmune. Aparentemente, sólo una pequeña proporción de leucocitos expresa receptores opioides, y probablemente los que los expresan sólo lo hacen bajo ciertas condiciones específicas. Si este es el caso, es probable que los estudios de unión al receptor mediante la técnica de *binding* no sea lo suficientemente sensible para detectar la presencia del receptor opioide en este sistema fisiológico (130).

Con el fin de confirmar la presencia de receptores opioides en células de sangre periférica, nuestro grupo ha analizado recientemente, mediante RT-PCR, la expresión de receptores opioides en líneas celulares de diferentes estirpes hematopoyéticas, poniendo de manifiesto la presencia de transcritos de los tres tipos de receptores en líneas celulares de estirpe mieloide, T y B. Estos resultados representan la primera evidencia experimental de expresión de receptores opioides en células del sistema inmune y han sido parcialmente confirmados recientemente por Kieffer y cols (131). Las diferencias de expresión entre nuestro trabajo y el de Kieffer y cols, pueden ser debidas a las diferentes líneas celulares incluidas en los estudios y permite sugerir que la expresión de receptores opioides en células del sistema hematopoyético no es homogénea y, probablemente esté sujeta a modulación por factores exógenos. Recientemente, el grupo de Chuang y cols ha encontrado expresión de los tres receptores opioi-

des en células del sistema inmune del mono y de humanos usando esta misma técnica (132-134).

En resumen, la expresión de receptores opioides no está confinada de manera exclusiva a células del sistema nervioso, detectándose expresión de estos receptores en tejidos periféricos. No obstante, como hemos mencionado anteriormente, la demostración de que estos genes se transcriben en células del sistema hematopoyético y los métodos empleados para obtener RNA de tejidos periféricos no permiten descartar que esta expresión sea secundaria a contaminación por células sanguíneas. Lo que no admite ninguna duda es la expresión de receptores opioides en células del sistema inmune, resultado que confirma la estrecha relación entre sistema inmune y sistema nervioso y abre una interesante vía de investigación que permita conocer mejor la interrelación entre estos dos sistemas.

Correspondencia:

Raquel E. Rodríguez
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca
Avda. Campo Charro, s/n
37007 Salamanca
Tel.: (923) 29 45 53
Fax: (923) 29 46 26
E-mail: requelmi@gugu.usal.es

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1993; 89:5391-5393.
2. Goldstein A, Lowney LI, Pal BK. Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1971;68:1742-1747.
3. Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: its demonstration in nervous tissue. *Science*. 1973;179:1011-1014.
4. Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ^3H etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1973;70:1947-1949.
5. Terenius L. Stereospecific interaction between narcotic analgesic and synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol*. 1973;32:317-320.
6. Kuhar MJ, Pert CB, Snyder SH. Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature*. 1973;245:447-451.

7. Kosterlitz HW, Waterfield AA. In vitro models in the study of structure-activity relationships of narcotic analgesics. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1975;15:29-47.
8. Hughes JT. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphin. *Brain Res.* 1975;88:295-306.
9. Bradbury AF, Smith DG, Snell CR, et al. C fragment of lipotrpip has a high affinity for brain opiate receptors. *Nature.* 1976;260:793-795.
10. Noda M, Furutani Y, Takahashi H, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal prepro-enkephalin. *Nature.* 1982;295:202-206.
11. Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neoendorphine/dynorphin precursor. *Nature.* 1982;298:245-249.
12. Nakanishi S, Inoue A, Kita T, et al. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotrophin- β -lipotropin precursor. *Nature.* 1979;278:423-427.
13. Martin WR. Opioid antagonists. *Pharmacol Rev.* 1967; 19:463-521.
14. Rothman RB, Pert CB, Jacobson AE, et al. Morphine noncompetitively inhibits [3 H] leucine enkephaline binding to membranes lacking type II δ binding sites: evidence for a two-site allosteric model. *Neuropeptides.* 1984;4:257-260.
15. Pasternak GW, Wood PJ. Multiple μ opiate receptors. *Life Sci.* 1986;38:1889-1898.
16. Leslie FM, Chavkin C, Cox BM. Opioid binding properties of brain and peripheral tissues: Evidence for heterogeneity in opioid ligand binding sites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980;214:395-402.
17. Werz MA, Grega DS, Mc Donald RL. Actions of μ , δ and κ opioid agonists on mouse primary afferent neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987;243:258-263.
18. Goldstein A, Naidu A. Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures. *Mol Pharmacol.* 1989;36:265-272.
19. Corbett AD, Patterson SJ, Kosterlitz HW. Opioids. En *Handbook of experimental Pharmacology.* 1991.
20. Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, et al. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.* 1988;11:308-314.
21. Rodríguez RE, Leighton G, Hill RG, et al. In vivo evidence for spinal δ -opiate receptor operated antinociception. *Neuropeptide.* 1986;8:221-241.
22. Mansour A, Fox CA, Akil H, et al. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* 1995;18:22-29.
23. Delfs JM, Yu L, Ellison GD, et al. Regulation of the μ opioid receptor mRNA in rat globus pallidus: effects of enkephalin increases induced by short- and long-term haloperidol administration. *J Neurochem.* 1994;63:777-780.
24. Handa BK, Lane AC, Lord JAH, et al. Analogues of β -LPH 61-64 possessing selective agonist activity at μ -opiate receptors. *Eur J Pharmacol.* 1981;70:531-540.
25. Werling LL, Zarr GD, Brown SR, et al. Opioid binding to rat and guinea neural membranes in the presence of physiological cations at 37° C. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1985;233:722-728.
26. Corbett AD, Gillam MGC, Kosterlitz HW, et al. Tyr-D-Pen-Gly-Phe-L-Pen and Tyr- D- Pen-Gly- Phe- D-Pen are selective ligands for the δ -binding site. *Br J Pharmacol.* 1983;80:669-672.
27. Mosberg HI, Hurst R, Hruba VJ, et al. Conformationally constrained cyclic enkephalins show pronounced δ receptor selectivity. *Life Sci.* 1983;32:2565-2569.
28. Von Voigtlander PF, Lahti RA, Ludens JH. U-50488: A selective and structurally novel non- μ (κ) opioid agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983;224:7-12.
29. Lahty RA, Von Voigtlander PF, Barshuhn C. Properties of a selective κ agonist, U-50,488. *Life Sci.* 1982;31: 2257-2260.
30. Simon E. Opioid receptors and endogenous opioid peptides. *Med Res Rev.* 1991;11:357-374.
31. Herz A. Ed. Opioids I. New York, Springer-Verlag, 1993.
32. Lutz R, Pfister H. Opioid receptors and their pharmacological profile. *J Receptor Res.* 1992;12:267-286.
33. Portoghese PS, Moe S, Takemori A. A selective δ_1 opioid receptor agonist derived from oxymorphone: evidence for separate recognition sites for δ_1 opioid receptor agonists and antagonists. *J Med Chem.* 1993;26: 2572-2574.
34. Schiller PW. Development of receptor selective opioid peptide analogs as pharmacological tools and potential drugs. En *Opioids I*; Herz A., ed. New York, Springer-Verlag, 1993,681-710.
35. Sofuoglu M, Portoghese PS, Takemori A. Cross-tolerance studies in the spinal cord of beta-FNA-treated mice provides further evidence for δ opioid receptor subtypes. *Life Sci.* 1991;49:153-156.
36. Sofuoglu M, Portoghese PS, Takemori A. Differential antagonism of δ opioid agonists by naltrindole and its benzofuran analog (NTB) in mice: evidence for δ opioid receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;257: 676-680.
37. Mattia A, Farmer S, Takemori A, et al. Spinal opioid δ antinociception in the mouse: mediation by a 5'-NTII sensitive delta receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;260:518-525.
38. Clark JA, Lui L, Price M, et al. κ opioid receptor multiplicity: evidence for two U50,488 sensitive κ_1 subtypes and a novel κ_3 subtype. *J Pharmacol. Exp Ther.* 1989;251:461-468.
39. Jaffe JM, Martin WR. Opioid analgesics and antagonists. En *The Pharmacological basis of therapeutics*; Gilman, A., Rall, J., Nies, A., Taylor, P., eds. New York, Pergamon Press, 1990,485-573.
40. Pasternak GW. Multiple morphine and enkephalin receptors and the relief of pain. *J Am Med Ass.* 1988;259: 1362-1367.
41. Loh HH, Smith AP. Molecular characterization of opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:123-147.
42. Schofield PR, McFarland KC, Hayflick JS, et al. Molecular characterization of a new immunoglobulin superfamily protein with potential roles in opioid binding and cell contact. *EMBO J.* 1989;8:489-495.

43. Gramsch CH, Schulz R, Kosin S, et al. Monoclonal anti-idiotypic antibodies to opioid receptors. *J Biol Chem.* 1988;263:5853-5859.
44. Coscia CJ, Szucs M, Barg J, et al. A monoclonal anti-idiotypic antibody to μ and δ opioid receptors. *Mol Brain Res.* 1991;9:299-306.
45. Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, et al. The δ opioid receptor. Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1992;89:12048-12052.
46. Evans CJ, Keith DE, Morrison H, et al. Cloning of a δ opioid receptor by functional expression. *Science.* 1992;258:1952-1955.
47. Abood ME, Noel MA, Farnsworth JS, et al. Molecular cloning and expression of a δ opioid receptor from rat brain. *J Neurosci Res.* 1994;37:714-719.
48. Bzdega T, Chin H, Kim H, et al. Regional expression and chromosomal localization of the δ opiate receptor gene. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1993;90:9305-9309.
49. Knapp RJ, Malatynska E, Fang L, et al. Identification of a human δ opioid receptor: cloning and expression. *Life Sci.* 1994;54:463-469.
50. Chen Y, Mestek A, Liu J, et al. Molecular cloning of a rat κ opioid receptor reveals sequence similarities to the μ and δ opioid receptors. *Biochem J.* 1993;295:625-628.
51. Yasuda K, Raynor K, Kong H, et al. Cloning and functional comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1993;90:6736-6740.
52. Yakovlev AG, Krueger KE, Faden AI. Structure and expression of a rat κ opioid receptor gene. *J Biol Chem.* 1995;270:6421-6424.
53. Xie GX, Meng F, Mansour A, et al. Primary structure and functional expression of a guinea pig κ opioid (dynorphin) receptor. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1994;91:3779-3783.
54. Minami M, Toya T, Katao Y, et al. Cloning and expression of a cDNA for the rat κ opioid receptor. *FEBS Lett.* 1993;329:291-295.
55. Meng F, Xie GX, Thompson RC, et al. Cloning and pharmacological characterization of a rat κ opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1993;90:9954-9958.
56. Mansson E, Bare L, Yang D. Isolation of a human κ opioid receptor cDNA from placenta. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1994;202:1431-1437.
57. Li S, Zhu J, Chen C, et al. Molecular cloning and expression of a rat κ opioid receptor. *Biochem J.* 1993;295:629-633.
58. Nishi M, Takeshima, H, Fukuda, et al. cDNA cloning and pharmacological characterization of an opioid receptor with high affinities for κ subtype-selective ligands. *FEBS Lett.* 1993;330:77-80.
59. Chen Y, Mestek A, Liu, J, et al. Molecular cloning and functional expression of a μ opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol.* 1993;44:8-12.
60. Bunzow JR, Zhang G, Bouvier C, et al. Characterization and distribution of a cloned rat μ opioid receptor. *J Neurochem.* 1995;64:14-24.
61. Minami M, Onogi T, Toya, T, et al. Molecular cloning and in situ hybridization histochemistry for rat μ opioid receptor. *Neurosci Res.* 1994;18:315-322.
62. Kaufman DL, Keith DE, Anton B, et al. Characterization of the murine μ opioid receptor gene. *J Biol Chem.* 1995;270:15877-15883.
63. Thompson RC, Mansour A, Akil H, et al. Cloning and pharmacological characterization of a rat μ opioid receptor. *Neuron.* 1993;11:903-913.
64. Wang JB, Imai Y, Eppler CM, et al. μ opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1993;90:10230-10234.
65. Zastawny RL, George SR, Nguyen T, et al. Cloning, characterization, and distribution of a μ opioid receptor in rat brain. *J Neurochem.* 1994;62:2099-2105.
66. Bunzow JR, Sáez C, Mortrud M, et al. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a μ , δ or κ opioid receptor type. *FEBS Lett.* 1994;347:284-288.
67. Chen Y, Fan Y, Liu J, et al. Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett.* 1994;347:279-283.
68. Fukuda K, Kato S, Mori K, et al. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett.* 1994;343:42-46.
69. Lachowicz JE, Shen Y, Monsma FJ, et al. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem.* 1995;64:34-40.
70. Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, et al. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 1994;341:33-38.
71. Wang JB, Johnson PS, Imai Y, et al. cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett.* 1994;348:75-79.
72. Wick MJ, Minnerath SR, Lin, et al. Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned μ , δ and κ opioid receptors. *Mol Brain Res.* 1994;27:37-44.
73. Meunier JC, Mollereau C, Toll L, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor like ORL1 receptor. *Nature.* 1995;377:532-535.
74. Reinscheid RK, Nothaker HP, Bourson A, et al. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid like G-protein coupled receptor. *Science.* 1995;270:792-794.
75. Zhu J, Yin J, Law PY, et al. Irreversible binding of cis-(+)-3-methylfentanyl isothiocyanate to the δ opioid receptor and determination of its binding domain. *J Biol Chem.* 1996;271:1430-1434.
76. Xue JC, Chen C, Zhu J, et al. Differential binding domains of peptide and non-peptide ligands in the cloned rat κ opioid receptor. *J Biol Chem.* 1994;269:30195-30199.
77. Xue JC, Chen C, Zhu J, et al. The third extracellular loop of the μ opioid receptor is important for agonist selectivity. *J Biol Chem.* 1995;270:12977-12979.
78. Wang JB, Johnson PS, Wu, et al. Human κ opiate receptor second extracellular loop elevates dynorphin's affinity for human μ -kappa chimeras. *J Biol Chem.* 1994;269:25966-25969.

79. Wang WM, Shahrestanifar M, Jin J, et al. Studies on μ and δ opioid receptor selectivity utilizing chimeric and site-mutagenized receptors. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1995;92:12436-12440.
80. Surrat CK, Johnson PS, Moriwaki A, et al. μ opiate receptor charged transmembrane domain aminoacids are critical for agonist recognition and intrinsic activity. *J Biol Chem.* 1994;269:20548-20553.
81. Onogi T, Minami M, Katao Y, et al. DAMGO, a μ opioid agonist, distinguishes between μ and δ opioid receptors around their first extracellular loops. *FEBS Lett.* 1995;357:93-97.
82. Meng F, Hoversten MT, Thompson RC, et al. A chimeric study of the molecular basis of affinity and selectivity of the κ and δ opioid receptors. Potential role of extracellular domains. *J Biol Chem.* 1995;270:12730-12736.
83. Minami M, Onogi T, Nakagawa T, et al. DAMGO, a μ opioid receptor selective ligand, distinguishes between μ and κ opioid receptors at a different region from that for the distinction between μ and δ opioid receptors. *FEBS Lett.* 1995;364:23-27.
84. Kong H, Raynor K, Yano H, et al. Agonists and antagonists bind to different domains of the cloned κ opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1994;91:8042-8046.
85. Kong H, Raynor K, Yasuda K, et al. A single residue, aspartic acid 95, in the δ opioid receptor specifies selective high affinity agonist binding. *J Biol Chem.* 1993; 268:23055-23058.
86. Fukuda K, Kato S, Mori K. Location of regions of the opioid receptor involved in selective agonist binding. *J Biol Chem.* 1995;270:6702-6709.
87. Fukuda K, Terasako K, Kato S, et al. Identification of the amino acid residues involved in selective agonist binding in the first extracellular loop of the δ and μ opioid receptors. *FEBS Lett.* 1995;373:177-181.
88. Chen C, Xue JC, Zhu J, et al. Characterization of irreversible binding of beta-funaltrexamine to the cloned rat μ opioid receptor. *J Biol Chem.* 1995;270:17866-17870.
89. Metzger TG, Ferguson DM. On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Lett.* 1995;375:1-4.
90. Schwyzer R. Membrane-assisted molecular mechanism of neurokinin receptor subtype selection. *EMBO J.* 1987; 6:2255-2259.
91. Raynor K, Kong H, Chen Y, et al. Pharmacological characterization of the cloned kappa, δ and μ opioid receptors. *Mol Pharmacol.* 1994;45:330-334.
92. Augustin LB, Felsheim RF, Min BH, et al. Genomic structure of the mouse δ opioid receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;207:111-119.
93. Min BH, Augustin LB, Felsheim RF, et al. Genomic structure and analysis of promoter sequence of a mouse μ opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1994; 91:9081-9085.
94. Nishi M, Takeshima H, Mori M, et al. Structure and chromosomal mapping of genes for the mouse κ opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C). *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205:1353-1357.
95. Liu HC, Lu S, Augustin LB, et al. Cloning and promoter mapping of mouse κ opioid receptor gene. *Biochem Biophys Res Com.* 1995;209:639-647.
96. Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, et al. The human δ opioid receptor: genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol.* 1994;46:1015-1021.
97. Simonin F, Gavériaux-Ruff C, Befort K, et al. κ opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1995;92:7006-7010.
98. Wang JB, Johnson PS, Persico, et al. Human μ opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett.* 1994;338:217-222.
99. Kaufman DL, Xia YR, Keith DE, et al. Localization of the δ opioid receptor gene to mouse chromosome 4 by linkage analysis. *Genomics.* 1994;19:405-406.
100. Kozak CA, Filie J, Adamson MC, et al. Murine chromosomal location of the μ and κ opioid receptor genes. *Genomics.* 1994;21:659-661.
101. Befort K, Mattéi MG, Roeckel N, et al. Chromosomal localization of the delta-opioid receptor gene to human 1p343.3-p36.1 and mouse bands by in situ hybridization. *Genomics.* 1994;20:143-145.
102. Yasuda K, Espinosa R, Takeda J, et al. Localization of the κ opioid receptor gene to human chromosome band 8q11.2. *Genomics.* 1994;19:596-597.
103. Zimprich A, Simon T, Höllt V. Cloning and expression of an isoform of the rat μ opioid receptor (rMOR1B) which differs in agonist induced desensitization from rMOR1. *FEBS Lett.* 1995;359:142-146.
104. Bare LA, Mansson E, Yang D. Expression of two variants of the human μ opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain. *FEBS Lett.* 1994;354:213-216.
105. Rossi GC, Pan YX, Brown GP, et al. Antisense mapping the MOR-1 opioid receptor: evidence for alternative splicing and a novel morphine-6 β -glucuronide receptor. *FEBS Lett.* 1995;369:192-196.
106. Stein C, Hassan AHS, Przewlocki R, et al. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1990;87:5935-5939.
107. Hassan AHS, Ableitner A, Stein C, et al. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience.* 1993;55:185-195.
108. Schäfer M, Imai Y, Uhl GR, et al. Inflammation enhances peripheral μ -opioid analgesia, but not m-opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol.* 1995;279:165-169.
109. Mansour A, Fox CA, Thompson RC, et al. μ -opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to μ -receptor binding. *Brain Res.* 1994;643:245-265.
110. Bartho L, Stein C, Herz A. Involvement of capsaicin-sensitive neurones in hyperalgesia and enhanced opioid antinociception in inflammation. Naunyn Schmiedeberg's. *Arch Pharmacol.* 1990;342:666-670.

111. Werz A, MacDonald RL. Opioid peptides selective for μ and δ opiate receptors reduce calcium-dependent action potential duration by increasing potassium conductance. *Neurosci Lett*. 1983;42:173-178.
112. Scroeder JE, Fischbach PS, Zheng D, et al. Activation of μ opioid receptors inhibits transient high and low threshold Ca^{2+} currents, but spares a sustained current. *Neuron*. 1991;6:13-20.
113. Yaksh TL. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res*. 1988;458:319-324.
114. Barber A, Gottschlich R. Opioid agonists and antagonists: an evaluation of their peripheral actions in inflammation. *Med Res Rev*. 1992;12:525-562.
115. Antonijevic I, Mousa SA, Schäfer M, et al. Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J Neurosci*. 1995;15:165-172.
116. Mansour A, Fox CA, Akil H, et al. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci*. 1995;18:22-29.
117. Barrallo A, González-Sarmiento R, Santos MV, et al. RT-PCR detection of opioid receptor mRNA in different tissues. *Analgesia*. 1995;1:272-277.
118. Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Comm*. 1996;218:877-881.
119. Cherubian CE, Millian SJ. The medical sequelae of narcotic addiction. *Ann Intern Med*. 1967;67:23-33.
120. Sapiro JD, Ball JC, Penn H. Epidemiology of opiate addiction in the United States; Ball J.C., Chambers C.D., eds. Springfield, Thomas, 1980,375.
121. Brown SM, Stimmel B, Taub RN. Immunologic dysfunction in heroin addicts. *Arch Intern Med*. 1974;134:1001-1006.
122. Mc Donough RJ, Madden JJ, Falek A. Alteration of T and null lymphocyte frequencies in the peripheral blood of human opiate addicts: in vivo evidence for opioid receptor sites on T lymphocytes. *J Immunol*. 1980;25:2539-2543.
123. Sharp BM, Keane WF, Suh HJ, et al. Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *Endocrinology*. 1985;17:793-795.
124. Fontana L, Fattorossi A, D'Amelio A, et al. Modulation of human concanavalin A-induced lymphocyte proliferative response by physiological concentrations of β -endorphin. *Immunopharmacol*. 1987;13:111-117.
125. Hemmick LM, Bidlack JM. β -Endorphin stimulates rat T lymphocyte proliferation. *J Neuroimmunol*. 1990;29:239.
126. Taub DD, Eisenstein TK, Geller EB, et al. Immunomodulatory activity of μ - and κ -selective opioid agonists. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:360-364.
127. Roy S, Ge BL, Ramakrishnan S, et al. (3H) Morphine binding is enhanced by IL-1-stimulated thymocyte proliferation. *FEBS Lett*. 1991;287:93-96.
128. Carr DJJ, De Costa BR, Kim C-H, et al. Opioid receptors on cells of the immune system: evidence for δ - and κ classes. *J Endocrinol*. 1989;122:161-168.
129. Sibinga NES, Goldstein A. Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Ann Rev Immunol*. 1988;6:219-249.
130. Bidlack JM, Joseph DB, Lawrence DMP. κ opioid receptors on three related thymoma cell lines. En *The brain-immune axis and substance abuse*; Sharp B., ed. New York, Plenum Press, 1995,23-27.
131. Gavériaux C, Peluso J, Simonin F, et al. Identification of κ and δ opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett*. 1995;369:272-276.
132. Chuang LF, Chuang TK, Killam KF, et al. δ opioid receptor gene expression in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Comm*. 1994;202:1291-1299.
133. Chuang LF, Chuang TK, Killam KF, et al. Expression of κ opioid receptors in human and monkey lymphocytes. *Biochem Biophys Res Comm*. 1995;209:1003-1010.
134. Chuang TK, Killam KF, Chuang LF, et al. μ opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochem Biophys Res Comm*. 1995;216:922-930.

REFERATAS

TRATAMIENTO DEL DOLOR DEL CANCER: CUANDO FRACASA LA MEDICACION ORAL

Tim J Lamer. (Mayo Clinic, Jacksonville, Florida. E.E.U.U.). *Mayo Clin Proc* 1994;69:473-480.

Se debaten los tratamientos, diferentes al oral, usados en el control del dolor oncológico. Se incluyen los opioides parenterales (infusión continua y analgesia controlada por el paciente), analgesia espinal (opioides, anestésicos locales, sistemas de infusión espinal, perspectivas futuras), blo-

queo neurológico (neurolítico y no neurolítico), tratamiento neuroquirúrgico (procedimientos neuroimplementativos y neuroablativos). En resumen, el dolor oncológico puede ser satisfactoriamente controlado, en la mayoría de los pacientes, con la ayuda de la oportuna medicación, procedimientos sintomáticos, adecuada terapéutica física, ayuda psicológica; y los pacientes cuyo dolor no pueda ser aliviado, deberán ser remitidos al especialista correspondiente, para otro tipo de terapéutica.

F. Collado