



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**PAPEL DE LOS RECEPTORES DELTA OPIOIDES EN LA DESCARGA
BASAL DE VESTÍBULO DE RATA**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

JOSÉ RAÚL SÁNCHEZ HERNÁNDEZ.

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. AIDA J. ORTEGA CAMBRANIS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA BUAP

MAYO 2018



DEDICATORIA

*A mis padres Magdalena Sánchez Hernández y Gelacio
Ramírez Maldonado, a mi abuela María Eugenia Adela
Sánchez Macedo por todo su amor incondicional, comprensión
y apoyo.*

*A todas aquellas personas que me han aportado algo a mi
crecimiento personal y profesional.*

*A mi esposa María Guadalupe Viedas Carmona que sin su
luz y amor no sería posible mi vida... ¡¡GRACIAS POR
TANTO AMOR!!*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los investigadores responsables del Laboratorio de Neurofisiología Sensorial, Dr. Enrique Soto Eguibar y la Dra. Rosario Vega Saénz de Miera, por permitirme realizar este proyecto de tesis. A la M. en C. Aida J. Ortega Cambranis por contribuir con su asesoría en mi formación académica y personal.

Agradezco al comité revisor de tesis por sus sugerencias y aportaciones para mejorar este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO	Pag.
RESUMEN	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. EL SISTEMA VESTIBULAR	4
2.1 Las células ciliadas.....	5
2.2 Vías vestibulares centrales.....	8
3. PÉPTIDOS OPIOIDES	11
3.1 Receptores Opioides.....	12
3.2 D-Penicilamina ² D-Penicilamina ⁵ Encefalina (DPDPE).....	14
4. JUSTIFICACIÓN	16
5. HIPÓTESIS	17
6. OBJETIVOS	17
7. METODOLOGÍA	18
7.1 Animales de experimentación.....	18
7.2 Obtención de la preparación.....	18
7.3 Soluciones y fármacos utilizados.....	19
7.4 Aplicación.....	20
7.5 Técnica de registro.....	20
7.6 Análisis estadístico.....	21
8. RESULTADOS	22
9. DISCUSIÓN	28
10. CONCLUSIÓN	31
11. REFERENCIAS	32

Resumen

El sistema vestibular forma parte de una compleja red de mecanismos propioceptivos, encargados del mantenimiento del equilibrio y la postura. En los mamíferos se encuentra formado por dos órganos otolíticos, utrículo y sáculo, además por los canales semicirculares anterior, posterior y horizontal. Este sistema se comunica con el sistema nervioso central, los cambios detectados por los órganos que lo forman, son enviados en forma de impulsos nerviosos a los núcleos vestibulares. Las células ciliadas liberan neurotransmisores en el espacio sináptico que conecta con el nervio vestibular aferente de manera espontánea, lo cual se conoce como descarga basal, dicha descarga puede modificarse mediante estímulos mecánicos o fármacos. En este trabajo se estudió papel de receptores opioides de tipo delta en el vestíbulo y su efecto en la descarga basal del nervio vestibular, para ello se analizó el efecto de la [D-Penicilamina₂, D-Penicilamina₅] Encefalina (DPDPE) aplicada por microperfusión en la preparación de vestíbulo aislado de la rata, con la técnica de registro extracelular multiunitario. Las concentraciones del fármaco utilizadas fueron 3 μ M, 300 nM, 100 nM, 10 nM y 3 nM. El efecto fue medido a los 30 segundos, 3 minutos y 10 minutos posteriores de la aplicación y comparados con el registro control utilizando. Los resultados fueron analizados y se tomaron como estadísticamente significativos aquellos con una $P < 0.05$. Sobre la descarga basal se observaron dos tipos de efectos, un efecto excitador (aumento de la frecuencia de descarga) que fue estadísticamente significativo a la concentración de 100nM a los 30 segundos de la aplicación, y un efecto inhibitor (disminución sobre la frecuencia de descarga), que fue estadísticamente significativo a la concentración de 300nM a los 10 min después de la aplicación (300 nM, $P=0.03$; 10nM, $P=0.04$; 3nM, $P=0.01$). Estos resultados sugieren que los receptores delta opioides podrían estar participando como moduladores de la frecuencia de descarga.

2. ABREVIATURAS

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ACH: Acetil colina

AMP_c: Adenosin monofosfato cíclico

ATP: Trifosfato de adenosina

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CSs: Canales semicirculares

CV: Coeficiente de variación

DOR: Receptor delta opioide

DPDPE: (D-Pen², D-Pen⁵)-Encefalina

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GTP: Guanosín trifosfato

GDP: Guanosín difosfato

IPS: Impulsos por segundo

KOR: Receptor kappa opioide

MOR: Receptor mu opioide

NMDA: N-metil, D- aspartato

NV: Núcleo vestibular

ORL: Receptor similar a opioide

PKA: Protein cinasa A

PKC: Protein cinasa

VOR: Reflejo vestíbulo-ocular

1. INTRODUCCIÓN

El sistema vestibular forma parte de una compleja red de mecanismos propioceptivos. En el humano el aparato vestibular tiene tres funciones principales: 1) Participa en la sensación subjetiva del movimiento y de la orientación espacial, permitiéndonos estimar la posición de la cabeza en el espacio con seis grados de libertad: tres angulares y tres lineales. 2) Las entradas vestibulares al sistema de control de la postura permiten ajustar la actividad muscular y la posición del cuerpo para evitar caídas. 3) La influencia vestibular a los núcleos oculomotores permite estabilizar los movimientos oculares y la posición de los ojos en el espacio durante movimientos de la cabeza (Broussard *et.al.*, 2011; Latridou *et. al.* 2013), el mantenimiento del equilibrio y la postura; también contribuye a la diferenciación espacial entre arriba y abajo, el establecimiento de la línea media vertical aparente del cuerpo y funciona como un sensor inercial para la detección del desplazamiento en el espacio (Cullen, 2012). Junto con la información proveniente de receptores somáticos y viscerales, participa en la generación de un mapeo de la posición del cuerpo en el espacio y contribuye a formar el esquema corporal (Highstein, 2004). Éste es uno de los sistemas sensoriales más primitivos y conservados entre las distintas especies animales. Los estatocistos en los invertebrados son los análogos de los órganos otolíticos; mientras que, los canales semicirculares son exclusivos de vertebrados. La línea lateral es el órgano encargado de la percepción del movimiento del agua y responsable de la orientación de los desplazamientos de animales acuáticos, hay evidencia de ser un carácter evolutivo bastante conservado, ya presente desde los peces Agnatos del periodo Silúrico y en los peces primitivos como la lamprea hasta la larva de los anfibios; toma su nombre de la disposición céfalocaudal de mecanorreceptores sensoriales llamados neuromastos a lo largo de las caras laterales del cuerpo y sus neuronas asociadas correspondientes, esta estructura deriva de la placoda pre-ótica y de las células de la cresta neural (Collazo *et. al.* 1994; Gacek, 1974; Fritzsich y Straka, 2014).

2. EL SISTEMA VESTIBULAR

El sistema vestibular funciona como un propioceptor que transduce y codifica información del movimiento de la cabeza en las tres dimensiones, se encuentra localizado en el laberinto óseo, embebido en el hueso temporal del cráneo formando parte del oído interno, se compone por un conjunto de órganos organizados en cinco órganos sensoriales que, complementados con el oído contralateral, detectan aceleraciones tanto angulares como lineales. Cualquier movimiento corporal en el espacio involucra tanto un componente rotatorio como uno de traslación. Los canales semicirculares (CSs) anterior, posterior y horizontal responden a aceleraciones rotatorias debidas movimiento de la cabeza o el cuerpo (Holstein *et. al.*, 2004; Kandel, 2013). Cada CS posee un engrosamiento en uno de sus extremos denominado ampolla o ámpula, en el interior de esta se encuentra una región conocida como cresta, donde se alojan las células sensoriales (células ciliadas); (Guyton y Hall, 2001).

Los órganos otolíticos detectan aceleraciones lineales (ya sean debidas a cambios de orientación con respecto a la gravedad o translaciones) como arriba y abajo o bien adelante y atrás (Figura1) (Eatock, 2011); debido a que dentro de estos órganos se localiza una matriz gelatinosa con cristales de carbonato de calcio que en su conjunto se le denomina masa otolítica; a su vez la masa otolítica se encuentra localizada sobre la mácula, zona de los órganos otolíticos en la que se encuentran las células sensoriales ciliadas (Figura 2).

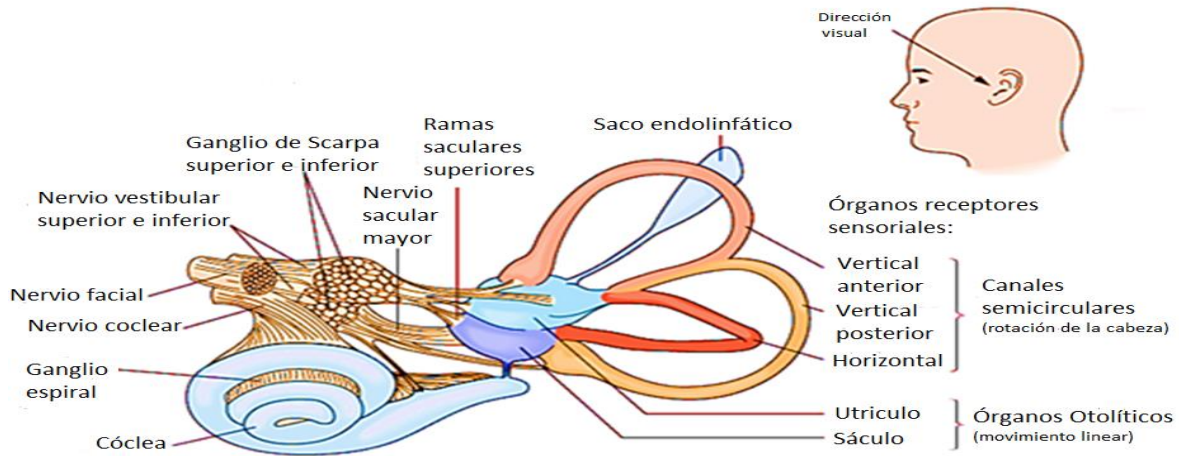


Figura 1.- Esquema del aparato vestibular. En la figura es posible distinguir la forma en espiral característica de la cóclea en la proximidad del aparato vestibular. En el aparato vestibular se observa la ubicación del utrículo y el sáculo (azul y morado respectivamente). Los canales semicirculares anterior (color rosa), posterior (amarillo) y horizontal (naranja). Las ramas aferentes provenientes de la sinapsis en la cúpula de los canales semicirculares se unen posteriormente para componer los ganglios de Scarpa superior e inferior, los nervio vestibular superior e inferior. También se muestran el nervio facial, nervio coclear y el ganglio espiral; estos últimos pertenecientes a la cóclea. Fuente: Modificado de Kandel *et.al.* (2013).

2.1 Células ciliadas

Las células presentan en la parte apical de 50 a 100 estereocilios que son micro vellosidades formadas por actina, además tienen un solo kinocilio, cilio verdadero que se localiza excéntricamente conformado por microtúbulos en una disposición de 9+2, todos ellos se encuentran unidos entre sí por una estructura llamada “uniones de punta” (Gillespie, 1995). Los cilios se organizan de tal modo que el kinocilio se encuentra desplazado hacia un extremo de la superficie apical mientras que los estereocilios más grandes se encuentra adyacentes al kinocilio y van disminuyendo su tamaño conforme se alejan de éste en la superficie apical de la célula ciliada (Deans, 2013).

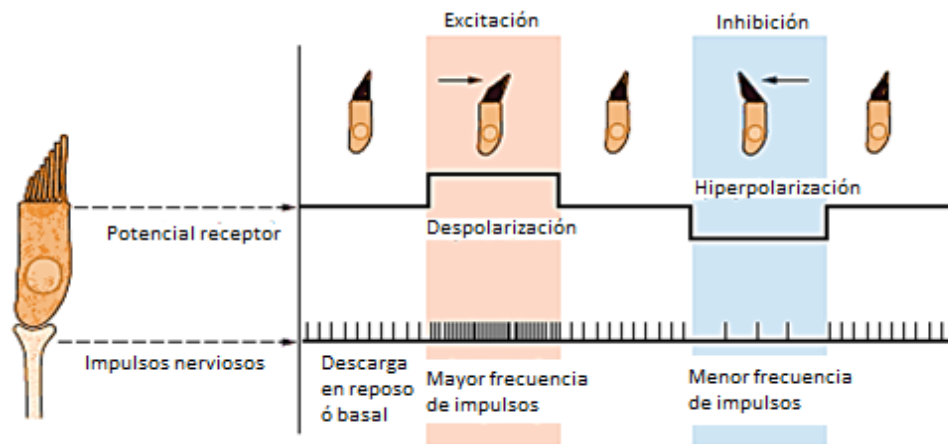


Figura 2.- Proceso de mecanotransducción. En la célula ciliada al producirse un estímulo (movimiento angular o lineal) el movimiento inercial de la endolinfa induce deflexión de los cilios en dirección al kinocilio, induciendo la apertura de canales de Ca^{++} de modo que la célula ciliada se despolariza (banda naranja) y da inicio a la vía de señalización desencadenando la liberación de un neurotransmisor, este aumenta la frecuencia de descarga de los potenciales de acción en la neurona aferente. Cuando la deflexión de los cilios es en el dirección opuesta al kinocilio, se produce una inhibición, cerrando los canales permitiendo la hiperpolarización de la célula ciliada (banda azul), disminuyendo la liberación de neurotransmisores y a su vez decayendo la frecuencia de descarga de los potenciales de acción en la neurona aferente. Fuente: Modificado de Kandel *et al.*, (2013).

En el interior del laberinto membranoso se encuentra un líquido extracelular denominado endolinfa, cuya composición difiere de los demás líquidos extracelulares por su alta concentración de iones K^+ y baja concentración de iones Na^+ , estas características la hacen diferente de la perilinfa, que posee concentraciones iónicas similares a otros líquidos extracelulares como el plasma o el fluido cerebro espinal (Leefmans *et al.*, 2009).

Las aceleraciones de la cabeza tanto lineales como angulares, producen movimiento de la endolinfa, y es este movimiento del líquido endolinfático lo que produce la deflexión inercial sobre la cúpula (una masa de mucopolisacáridos que contienen embebidas las terminales apicales de las células ciliadas (estereocilios) y que ocupa el espacio entre el techo del ámpula y la superficie apical de la cresta) y la subsecuente deflexión de los cilios induce cambios conformacionales en los

canales de transducción permitiendo la apertura de canales iónicos principalmente de Ca^{2+} y K^+ , debido a la presencia en la punta de cada estereocilio de proteínas conocidas como uniones de punta (Ricci *et al.*, 2006). Si la deflexión se dirige en sentido del kinocilio, la membrana celular se despolariza e induce la liberación del neurotransmisor y se hiperpolariza si la deflexión se dirige en sentido opuesto al kinocilio disminuyendo la liberación de neurotransmisor (Figura 2; Kandel, 2013). El neurotransmisor liberado por las células ciliadas es el glutamato, este se une a diferentes subtipos de receptores a N-metil, D- aspartato (NMDA), Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA/Kainato) y metabotrópicos. Las neuronas eferentes en las células ciliadas son esencialmente colinérgicas e interactúan con receptores muscarínicos y nicotínicos, pero también liberan el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), sustancia P y encefalinas, que actúan sobre receptores específicos (figura 3); (Soto *et. al*; 2013).

Las células ciliadas se pueden clasificar por la morfología de su cuerpo celular en cilíndricas o con forma de matraz. También dependiendo de la morfología de la sinapsis neurona-célula se pueden clasificar como células ciliadas tipo I las cuales poseen una terminación sináptica con forma de cáliz o células ciliadas de tipo II cuyas terminales sinápticas tienen forma de botón (figura 3); (Goldberg, 1984; Highstein, 2014).

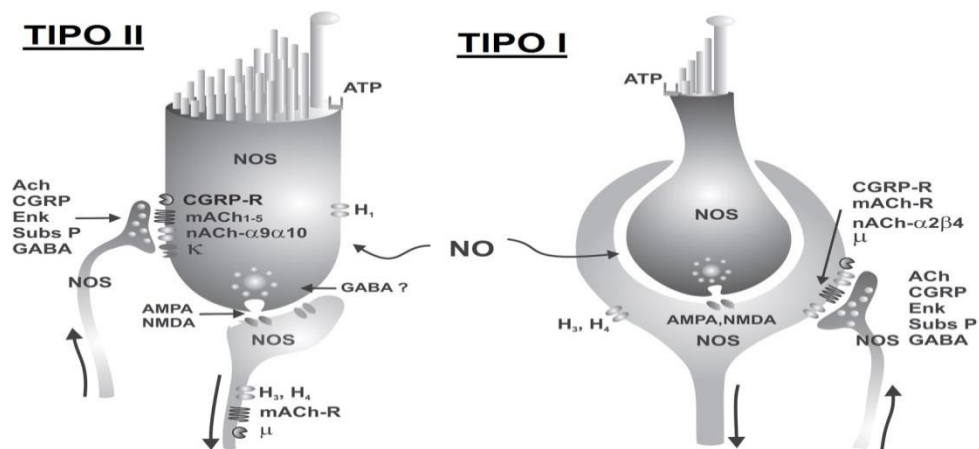


Figura 3.- Clasificación de las células ciliadas vestibulares de acuerdo con el tipo de sinapsis en células ciliadas tipo I y tipo II. De derecha a izquierda en el esquema se muestra la sinapsis aferente en forma de cáliz y la eferente hace sinapsis sobre la aferente, esta morfología de la sinapsis es característica de las células ciliadas tipo I, en cuanto a las células ciliadas tipo II las sinapsis tanto aferente como eferente presentan forma de botón. En el esquema se observa los diferentes tipos de receptores y moduladores como Ach (acetilcolina), CGRP (péptido relacionado al gen de la calcitonina), subs P (substancia P), enk (encefalinas) y GABA (ácido γ-aminobutírico) involucrados en la mecano transducción (Modificado de Soto *et. al.*, 2013).

2.2 Vías vestibulares periféricas y centrales

Las aferencias provenientes de estructuras vestibulares se encuentran conformadas por grupos de neuronas bipolares que dan origen a la rama superior e inferior del nervio vestibular y cuyo soma se encuentra en el ganglio de Scarpa, la rama superior está formada por la unión de los nervios que inervan la mácula utricular, la cresta del canal semicircular anterior y horizontal. Mientras las aferencias provenientes de la mácula el sáculo y la cresta del canal semicircular posterior conforman la rama inferior (Gaceck, 2002). Se unen a la vía del VIII par craneal (Rohregger y Dieringer, 2003) el cual a su vez se proyecta hacia los núcleos vestibulares ipsilaterales localizados en el bulbo raquídeo y la porción caudal de la protuberancia, aunque existen colaterales que se dirigen de manera directa desde los órganos vestibulares hacia el nódulo flóculo nodular del cerebelo. En los núcleos vestibulares (NV) se pueden encontrar divisiones como Núcleo triangular de Schwalbe (mediano, medial o interno) que recibe fibras de los canales semicirculares y también aferencias espinales. Núcleo de Deiters (o

lateral) en función de las vías que recibe, se pueden diferenciar en él un área retroventral que recibe aferencias de utrículo y sáculo, así como algunas aferencias del canal semicircular anterior además de otra área dorsocaudal, que recibe aferencias del cerebelo y la médula espinal. Desde este núcleo parte el fascículo vestibulo-espinal lateral que se dirige a las astas anteriores medulares. El área retroventral proyecta fibras sobre la médula cervical, mientras que el área dorsocaudal proyecta sobre la médula lumbar y los músculos extensores cervicales. El Núcleo de Betcherew (craneal o superior) también recibe fibras de los CSs, el núcleo de Roller (inferior, de la raíz descendente o caudal) recibe fibras vestibulares primarias procedentes de los CSs y otras fibras procedentes del sáculo, el de Lewandowsky situado entre el núcleo de Betcherew y el de Deiters. Por último el Núcleo del techo se encuentra situado en el vérmix cerebeloso, por encima de la oliva cerebelosa, por lo que no suele incluirse como parte del NV, sin embargo tiene importantes conexiones directas con los receptores vestibulares a través de la raíz dorsal del nervio vestibular (vía vestibulo-cerebelosa directa) (Marco, 1984; Guyton y Hall, 2001; Takahashi, 2007; Angelaki y Cullen, 2008; Bronstein, Patel and Arshad, 2015). Desde estos núcleos se originan proyecciones hacia los núcleos involucrados con el control oculomotor (par craneal II, IV y VI) por medio del fascículo longitudinal medial, así como la musculatura extensora anti gravitatoria del cuello y tronco por medio de los tractos vestibulo espinales lateral y medial. Los núcleos vestibulares tienen proyecciones dirigidas al núcleo ventroposterolateral de tálamo y de ahí hacia el giro postcentral o corteza somatosensorial primaria. Lo anterior da lugar a una vía de transmisión sensorial que hace consciente el movimiento y la orientación (Marcotti y Masetto, 2010; Soto y Vega, 2010; Grassi y Pettorossi, 2011). Los estímulos son transducidos y distribuidos mediante proyecciones glutamatérgicas, colinérgicas (principalmente) y GABAérgicas, al sistema oculomotor, esqueletomotor, visceral y tálamo-cortical, también se encuentran otros aminoácidos excitadores como el aspartato y homocisteato, capaces de activar receptores (NMDA y no-NMDA) de tipo glutamatérgicos (Whittaker, 1964; Vega, 1988; Patneau y Mayer, 1990; Soto y Chávez, 2001; Vega, 2003; Dememes, 2006; Angelaki y Cullen, 2008). La ruta

más corta implicada en el control del VOR (reflejo vestíbulo ocular) está compuesta por un arco de 3 neuronas que van de las aferencias vestibulares hasta las neuronas en el núcleo vestibular localizadas entre el bulbo raquídeo y la protuberancia; allí algunas fibras hacen sinapsis con neuronas de segundo orden y proyectan hacia las motoneuronas extraoculares (Cullen, 2012).

Las fibras aferentes del vestíbulo se pueden clasificar de acuerdo a la regularidad de su descarga, tomando en cuenta el coeficiente de variación (CV) de los intervalos entre espigas. El CV varía con el intervalo promedio, por lo tanto, Goldberg y colaboradores (1984) propusieron usar el coeficiente de variación normalizado (CV*) como una forma de clasificar la frecuencia de descarga de las aferentes vestibulares. Basándose en su CV* las neuronas aferentes del vestíbulo fueron clasificadas en: regulares ($CV^* < 0.10$), intermedias ($0.10 < CV^* < 0.20$) e irregulares ($CV^* > 0.20$). En el utrículo de pez dorado la liberación de neurotransmisores ha demostrado poseer características de liberación cuantica (Furukawa, 1978).

Existen fármacos que tienen efecto sobre el sistema vestibular y pueden clasificarse en dos categorías de acuerdo a su principal mecanismo de acción: primero tenemos a aquellos que actúan como neurotransmisores y neuromoduladores, en segundo lugar a aquellos que ejercen su efecto sobre los canales iónicos dependientes de voltaje (Soto *et al.*, 2013). Los aminoácidos excitadores (glutamato), histamina, colinérgicos, fármacos con efecto sobre receptores GABA y canales iónicos (antagonistas de Ca_2^+ , Na^+), corticosteroides y péptidos opioides se encuentran entre los su principal blanco de acción son los canales iónicos (Soto y Vega, 2009).

3. PÉPTIDOS OPIOIDES

Se han identificado 3 prohormonas peptídicas que dan origen a algunos péptidos opioides: la pro-opiomelanocortina (POMC) (Nakanishi *et al.*, 1979; Seo *et al.*, 2008) que da origen a la Met-enkefalina, la β -endorfina y la β -lipotropina. La proencefalina A (PENK) (Comb *et al.*, 1982; Mitchell *et al.*, 1995) produce 4 copias de Met-enkefalina, una de Leu-enkefalina, Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷ y Met-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ (Sollars, 2005). Por último la proencefalina B o prodinorfina (PDYN) (Kakidani *et al.*, 1982; Sahley *et al.*, 2013) contiene copia de dinorfina A, dinorfina B, α neoendorfina y β neoendorfina. Pro-endorfina da origen a la endorfina-1 y la endorfina-2 ambas aisladas del cerebro bovino

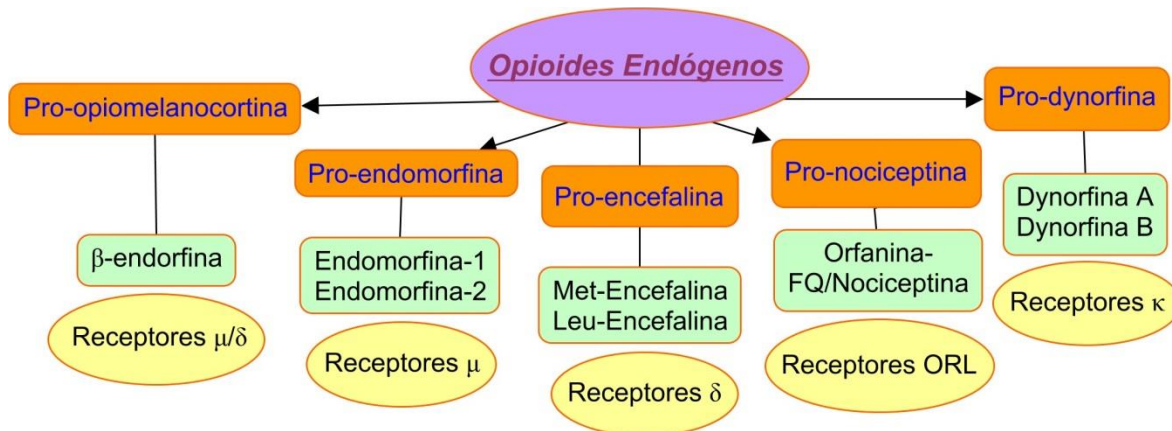


Figura 4.- Moléculas precursoras de opioides endógenos y sus receptores.

En este esquema se puede ver clasificado el grupo de moléculas precursoras (naranja), los opioides endógenos (verde) y sus respectivos receptores opioides (amarillo). Modificado de Bali, 2015.

Estos péptidos se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes tejidos (Wittert *et al.*, 1996; Freye, 2008) y juegan un papel fundamental en la nocicepción, las funciones endocrinas, cardiovasculares, gastrointestinales e inmunológicas. Así como a nivel de sistema nervioso central y periférico (Boom *et al.*, 1999; Maolood y Meister 2008) actuando como neurotransmisores o como neuromoduladores. Todos ellos presentan la secuencia conservada Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu en la posición N-terminal, que es indispensable para la activación de los receptores opioides (Akil *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 1993).

3.1 Receptores Opioides.

Los receptores μ , δ y κ (conocidos como MOR, DOR y KOR en la nomenclatura IUPHAR) son fisiológicamente activados por péptidos opioides endógenos y cuyo antagonista típico es la naloxona (Thompson, 1984) con excepción del ORL. Estos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G-heterotriméricas (GPCR) y se constituyen por 7 dominios transmembranales que forman 3 asas extracelulares y 3 intracelulares, el extremo amino terminal se encuentra se orienta hacia el espacio extracelular de la membrana mientras el carboxilo se orienta hacia el citosol. Los dominios transmembranales (TM I-VII), abundantes en aminoácidos con propiedades hidrofóbicas, son las zonas más conservadas (73-76 % de homología con respecto a los otros receptores) a diferencia de las regiones extracelulares las cuales son considerablemente divergentes (34-40 % de identidad). Los dominios transmembranales se unen por tres bucles extracelulares (E1, E2, E3) y tres intracelulares (I1, I2, I3) ricos en aminoácidos que les confieren propiedades hidrofílicas (Strosberg, 1991; Dascal, 2001; Audet y Bouvier, 2012).

El receptor ORL es blanco de un heptadecapeptido conocido como orfanina FQ (NOC/OFQ) o nociceptina y se encuentra clasificado en el grupo de los receptores opioides debido a su alto grado de homología en la secuencia que lo codifica (50% a un 60% de homología) con respecto a los otros receptores opioides, pero no ha mostrado afinidad a los ligando típicos de estos receptores (Meunier, 1997; Ashitaka e Ito, 2000; Kho *et al.*, 2006). Sin embargo, este receptor también es capaz de inhibir los canales de Ca^{2+} tipo N- (Murali *et al.*, 2012).

Los receptor μ presentan una alta afinidad a las endorfinas, sin embargo poseen poca afinidad a las encefalinas. Entre los agonistas para este receptor se encuentran la morfina, la endomorfina 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂), la endomorfina 2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) (Zadina, 1997; Manglik *et al.*, 2012), el fentanil, la E7384 y el [D-Ala₂, N-Me-Phe₄, Gly₅-ol]-encefalina (DAMGO). Existen dos subtipos de receptores, el μ_1 presente a nivel de sistema nervioso central y es principalmente

afín a la morfina, el subtipo μ_2 se localiza a nivel de sistema nervioso periférico y al contrario que el μ_1 posee poca afinidad a la morfina (Pasternak y Wood, 1986).

Evans y colaboradores en 1992 clonaron por primera vez el receptor opioide δ (DOR). Los receptores δ son afines a las encefalinas y poseen dos subtipos: δ_1 que se une con alta afinidad a la [D-Penicilamina², D-Penicilamina⁵] encefalina (DPDPE) (figura 5), al 3-[(4aS,12aR)-11-amino-2-methyl-1,3,4,5,12,12a-hexahidropirido[3,4-b]acridin-4a(2H)-yl]fenol (TAN-67), al [D-Ala², Leu⁵, Cys⁶]-enkephalin (DALCE) y 7-benzylidenenaltrexone (BNTX). El δ_2 que es altamente afín a [D-Ser, D-Leu] encefalina-treonina (DSLET) (Portoghese *et al.*, 1992; Kieffer, 1992; Van Rijn, 2013).

Los receptores κ poseen afinidad a la dinorfina y niravolina (RU 51599) presentan 2 subtipos, los κ_1 son sensibles al U50488 y los κ_2 que se acoplan al benzomorfan, bremazocina (Kieffer, 2002; Bhushan, 2004). Estudios de inmunoreactividad demostraron la presencia de estos receptores en las vías aferentes del sistema vestibular (Perachio y Kevetter, 1989; Popper y Wackym, 2001).

La mayoría los receptores opioides activan vías de señalización intracelulares reguladas por la actividad de las tres subunidades que conforman a las proteínas G-heterotrimericas: G_α , G_β y G_γ . La subunidad G_α hidroliza GTP en GDP causando cambios conformacionales que provocan la disociación del heterodímero $G_\beta\gamma$; ambos G_α y $G_\beta\gamma$ son capaces de activar múltiples cascadas de señalización efectoras (Wettschureck y Offermanns, 2005; Law, 2011; Zamponi y Currie, 2013). En este punto los efectos reportados más comunes son la inhibición de la adenilato ciclasa, la activación de la conductancia de K^+ , la inhibición de la conductancia de Ca^{2+} y la inhibición de la liberación de neurotransmisor (Williams, 2001; Fábían, 2001).

Pruebas de inmunoreactividad han demostrado la presencia de los 3 receptores opioides en las vías aferentes del sistema vestibular (Perachio y Kevetter, 1989; Popper *et al.*, 2001)

3.2 D-Penicilamina² D-Penicilamina⁵ Encefalina (DPDPE)

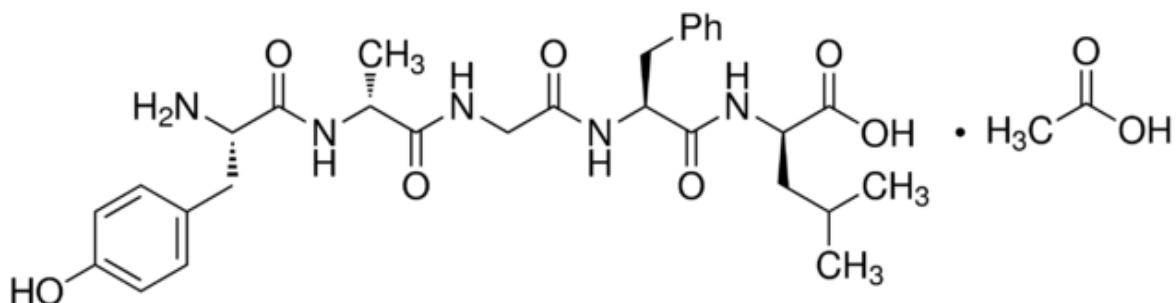


Figura 5.- Estructura de la D-Penicilamina² D-Penicilamina⁵ Encefalina (DPDPE). Fuente: Sigma Aldrich

Los agonistas naturales de los DOR son las encefalinas [Met⁵]-encefalina y la [Leu⁵]-encefalina, deltorfina I y deltorfina II y la dermencefalina (Hughes et al., 1975; Kreil et al., 1989; Erspamer et al., 1989). Las deltorfinas tienen una mayor afinidad a los DOR y son enzimáticamente más estables, sin embargo las encefalinas presentan una selectividad moderada a los DOR y su degradación enzimática se lleva a cabo rápidamente (figura 6).

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH	[Met ⁵]enkephalin
H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	[Leu ⁵]enkephalin
H-Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-NH ₂	Dermenkephalin
H-Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH ₂	Deltorphin I
H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH ₂	Deltorphin II

Figura 6. Estructura peptídica de los agonistas naturales afines a los DOR.

Debido a esto se han desarrollado análogos lineales de las encefalinas con una selectividad potenciada como la H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-OH (DADLE) (Beddell *et al.*, 1977), H-Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr-OH (DSLET) (Gacel *et al.*, 1980), H-Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Thr-OH (DTLET) (Zajac *et al.*, 1983), y H-Tyr-D-Cys(tBu)-Gly-Phe-Leu-Thr(tBu)-OH (BUBUC) (Gacel *et al.*, 1990). También se han

desarrollado péptidos opioides análogos a las encefalinas pero con estructuras cíclicas como el H-Tyr-c[D-Pen-Gly-Phe-D-Pen] (DPDPE) y el H-Tyr-c[D-Pen-Gly-Phe-Pen](DPLPE) con un fuerte efecto agonista sobre los DOR, en particular de los receptores δ (Mosberg, 1983a, 1983b; Erspamer *et al.*, 1989) y específicamente del subtipo δ_1 , mientras que la deltorfina lo es de los δ_2 (Collins *et al.*, 1996). El DPDPE ha sido utilizado ampliamente como una herramienta en estudios farmacológicos debido a que es capaz de pasar a través de la barrera hematovestibular (Soto *et al.* 2013), por su alto grado de selectividad sobre los receptores delta, también porque alterando su estructura es posible generar diferentes cambios en el grado de selectividad y la potencia del efecto (Sasaki *et al.*, 1991; Sasaki y Chiba, 1995; Bryant *et al.*, 1997).

4. JUSTIFICACION

Los estudios sobre los péptidos opioides es muy amplia debido a su presencia y la distribución de sus receptores en diferentes órganos y regiones tanto del sistema nervioso central como el sistema nervioso periférico (Wittert, 1996; Boom, 1999; Stein *et al.*, 2003; Fields y Margolis, 2015; Liu *et al.*, 2015). Son estudiados por su participación en el tratamiento del dolor y otros padecimientos (Ray y Monahan, 2004; Bodnar, 2013; Chung y Kieffer, 2013; Van Rijn, 2013) propuestos también como alternativas sin efectos secundarios o dependencia en el tratamiento de padecimientos como el síndrome de Meniere y vértigo. Sin embargo, la información acerca de los efectos que tienen en algunas regiones del sistema nervioso tanto central como periférico aun es escasa así como la caracterización de sus posibles efectos sistémicos. Considerando el papel que se ha demostrado tienen los DOR, KOR y MOR en el vestíbulo de otros grupos de vertebrados como el *ambystoma mexicanum* (Vega y Soto, 2003), resulta importante definir en mamíferos el papel de los DOR. Este trabajo se realizó con el fin de aportar información acerca de papel de los receptores opioides sobre la actividad eléctrica del nervio aferente vestibular de mamífero (Rata Long Evans) y tratar de determinar su efecto.

5. HIPÓTESIS

La [D-Pen², D-Pen⁵] encefalina (DPDPE) tiene un efecto modulador, inhibiendo la frecuencia de descarga basal del nervio vestibular aferente de mamífero debido a la activación de DOR específicos ubicados en estas fibras.

6. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el efecto del [D-Pen², D-Pen⁵] encefalina (DPDPE) sobre la actividad eléctrica basal de las neuronas aferentes del nervio vestibular de mamífero (rata Long Evans).

PARTICULARES

- Comparar el efecto del [D-Pen², D-Pen⁵] encefalina a diferentes concentraciones (3nM, 10nM, 100nM, 300nM y 3μM) sobre la descarga basal del nervio vestibular aferente de mamífero y analizar la relación dosis-respuesta correspondiente medido en diferentes lapsos de tiempo después de la aplicación del fármaco.
- Caracterizar la acción ejercida por el [D-Pen², D-Pen⁵] encefalina sobre la descarga basal del nervio vestibular aferente de mamífero.

7. METODOLOGIA

7.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Long Evans en un rango de edad de 13 a 15 días con peso aproximado entre 17 a 30 g. El cuidado y procedimientos con los animales fueron de conformidad con todas las normas que indica el Instituto Nacional de Salud en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio establecidas en la NOM- 062- ZOO- 1999. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

7.2 Obtención de la preparación de vestíbulo aislado.

Los animales fueron anestesiados con sevoflurano por inhalación y posteriormente sacrificados por decapitación. Para obtener la preparación de vestíbulo aislado se retiró la mandíbula haciendo cortes a nivel temporomandibular, la piel y la bóveda craneana fueron removidas, posteriormente se retiró la masa encefálica. Se separó el maxilar superior, se hizo un corte sagital en sentido anteroposterior de la base del cráneo, siguiendo el orificio del hueso occipital. De esta manera se obtienen ambos vestíbulos por separado. La disección termina después de remover el exceso de los huesos temporales. Se coloca el vestíbulo en la cámara de registro y por microdisección, usando un microscopio estereoscópico se retira el hueso para exponer el ámpula, el utrículo y el nervio,

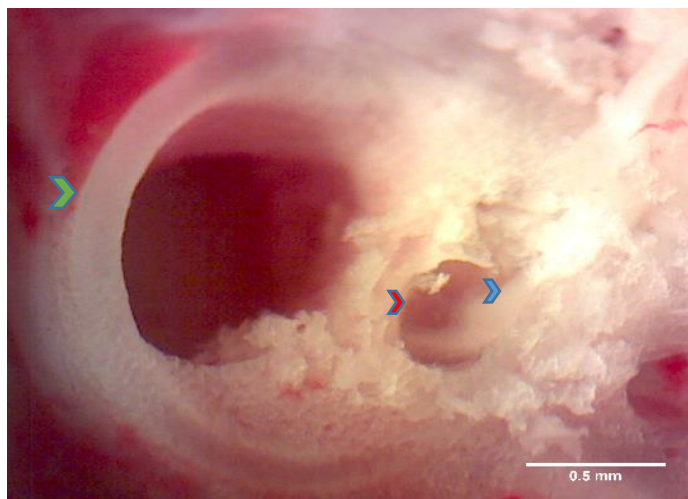


Figura 6.- Imagen del vestíbulo. La punta de flecha verde señala el canal semicircular anterior. La microdissección se realizó en el área sobre el ámpula del mismo canal (flecha roja) removiendo el hueso que cubre esa zona y exponiendo tanto el ámpula como la rama del nervio vestibular para el registro (flecha azul).

7.3 Soluciones y fármacos utilizados.

Una vez aislado el vestíbulo, se colocó al microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ-10) en una cámara de registro y se perfundió continuamente mediante perfusión gravitacional a 2.5ml por minuto con solución Tyrode para mamífero con la siguiente composición (en mM): NaCl 118, KCl 2.5, MgCl₂ 1, CaCl 2.5, NaHCO₃ 25, Na₂HPO₄ 1 (Brichta, 2005); burbujeada con gas carbógeno (95% O y 5% CO₂) con temperatura controlada $\pm 36.6^{\circ}$ C con un termostato (TC 324-B Warner Instruments Co.). El pH de la solución fue de 7.5. El fármaco utilizado fue DPDPE (Sigma Chemical Co., USA) preparado en alicuotas cuyas concentraciones fueron de 3nM, 10nM, 100nM, 300nM y 3 μ M.

7.4 Aplicación

La aplicación de los fármacos se hizo por microperfusión acercando la jeringa Hamilton de 100 μ l, cargada con 40 μ l de fármaco y expulsándolo en una sola dosis con un tiempo de aplicación de entre 2 y 3 segundos por presión sobre las aferencias de nervio vestibular y el ámpula para no producir demasiado ruido por el artefacto de aplicación.

7.5 Técnica de registro

La técnica de registro con la preparación de vestíbulo aislado permite observar la actividad eléctrica del nervio vestibular manteniendo íntegra la sinapsis entre las células ciliadas y la terminal aferente vestibular. Para este trabajo se hizo el registro de la descarga basal en 30 experimentos, durante un tiempo aproximado de 40 minutos dependiendo de la recuperación en la frecuencia de descarga, los primeros 12 minutos fueron tomados como control, posteriormente se aplicó el agonista DPDPE y se mantuvo el registro por 40 minutos en caso de que la frecuencia de descarga así lo permitiera, el registro se detuvo cuando la descarga basal ya no pudo ser observada por más de 5 min. .

Para obtener la respuesta del nervio vestibular se acercó un electrodo de borosilicato para succionar una pequeña parte del nervio vestibular aferente. Ejerciendo presión negativa, se creó un sello entre el electrodo y el nervio. Desde el electrodo se dirigió un cable a un amplificador (DP-301, Warner Instruments) este se conectó a un osciloscopio (Tektronix, 2216) y a un discriminador de ventana (WPI 121). La salida del discriminador de ventana se condujo a una computadora cargada con el programa Turbo Pascal FREC2000 (Soto y Vega, 1987) con el cual se analizaron los resultados y se construyeron los histogramas de frecuencia de descarga de las fibras aferentes. Para los experimentos se tomo en cuenta solo las descargas de las aferentes que alcanzaron o rebasaron el nivel de ventana configurada con el discriminador de ventana. Una vez que se observó la descarga basal del nervio vestibular se acercó una microperfusión cargada con 40 μ l del fármaco en la concentración correspondiente al ámpula y al nervio.

Cuando la descarga basal fue estable durante el control, se procedió a la aplicación del fármaco. Para determinar la presencia funcional del receptor opioide delta en la sinapsis del vestíbulo, aplicamos al agonista DPDPE a las concentraciones 3 μ M, 300 nM, 100 nM, 10 nM y 3 nM.

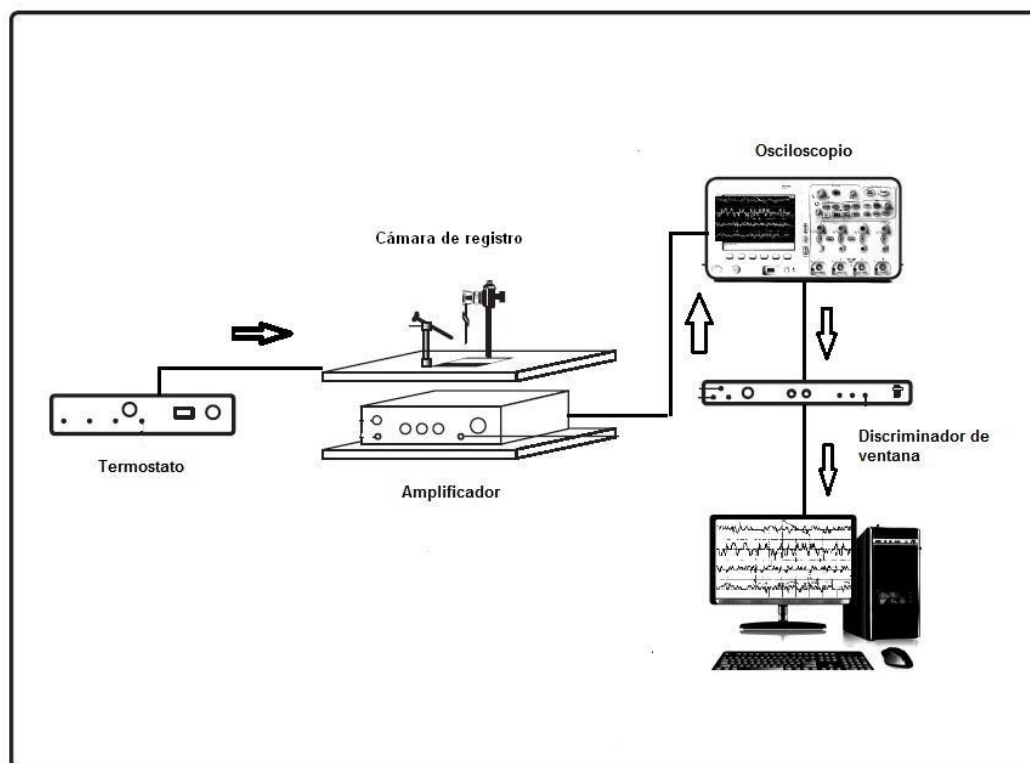


Figura 7.-Esquema del equipo de registro extracelular multiunitario. En la plataforma se encuentra la cámara de registro, el amplificador, los manipuladores, el electrodo de succión y el sistema de aplicación del fármaco. La señal una vez amplificada, es llevada a un osciloscopio, a un discriminador de ventana y a una computadora para su almacenamiento y posterior análisis. Modificado de Chávez *et al.*, 2000.

7.6 Análisis estadístico

Los registros de la actividad eléctrica obtenidos fueron analizados en una computadora con el programa Turbo Pascal Frec2000 el cual construye histogramas de frecuencia en función del tiempo, además procesa los datos para obtener los valores estadísticos de promedio y desviación estándar. Los datos fueron graficados posteriormente con el programa SigmaPlot 11.0. Para el análisis se tomaron bloques de 30 segundos. El bloque control se tomó 30 s antes de la

aplicación del fármaco. El primer registro se hizo 5 s después de la aplicación del fármaco. El segundo y tercer bloque se tomaron a los 3 y 10 minutos posteriores a la aplicación. Las diferencias entre los diferentes tiempos de medición se analizaron mediante una prueba de T. de Student pareada tomando como valores significativos cuando $p < 0.05$.

8. Resultados

Al hacer el análisis estadístico de las series experimentales se pudo observar que el fármaco modificó la descarga en las concentraciones 300 nM, 10 nM y 3 nM medidas 10 minutos después de la aplicación. Mientras que la concentración a 100nM modificó la descarga 30 segundos después a la aplicación. El efecto del fármaco y los valores de la prueba estadísticas se muestra a continuación en la tabla 1 y en la figura 9.

Tabla 1.- Actividad eléctrica basal del nervio vestibular de rata (Long Evans) a los cuales se les aplicó [D-Penicilamina2, D-Penicilamina5] Encefalina (DPDPE).				
Concentración	n. experimental	Frecuencia a los 30 seg. (%)±ES	Frecuencia a los 3 min. (%)±ES	Frecuencia a los 10 min. (%)±ES
3 μ M	5	306.4 \pm 152.0	122.5 \pm 33.7	105.2 \pm 43.4
300 nM	4	104.8 \pm 18.2	115.3 \pm 57.1	23.4 \pm 18.7
100 nM	12	163.4 \pm 27.9	97.8 \pm 11.7	89.0 \pm 11.8
10 nM	5	137.9 \pm 47.8	92.0 \pm 17.5	48.4 \pm 16.1
3 nM	4	400.5 \pm 306.5	87.0 \pm 13.2	26.6 \pm 9.9

Tabla 1. En la tabla se muestra las frecuencias de descarga a diferentes tiempos. Todos los valores fueron normalizados en porcentajes, el 100% corresponde a los controles correspondientes con cada concentración. **Los valores de *P** arrojados por la prueba estadística T (Pareada) se consideraron significativos cuando fueran menores a 0.05 (color rojo). Todas las mediciones fueron realizadas a los 30 seg, 3min y 10 min posterior a la aplicación y comparadas con su control 30 segundos antes de la aplicación, ****ES** Error Estándar.

Los experimentos fueron graficados en histogramas de frecuencia (figura 8) donde se muestran los valores de frecuencia contra tiempo durante el registro de

la actividad eléctrica del nervio vestibular, se observa en el eje Y los impulsos por segundo (IPS) mientras en el eje X el tiempo en minutos (min). Y fueron analizados conforme a lo establecido en la metodología.

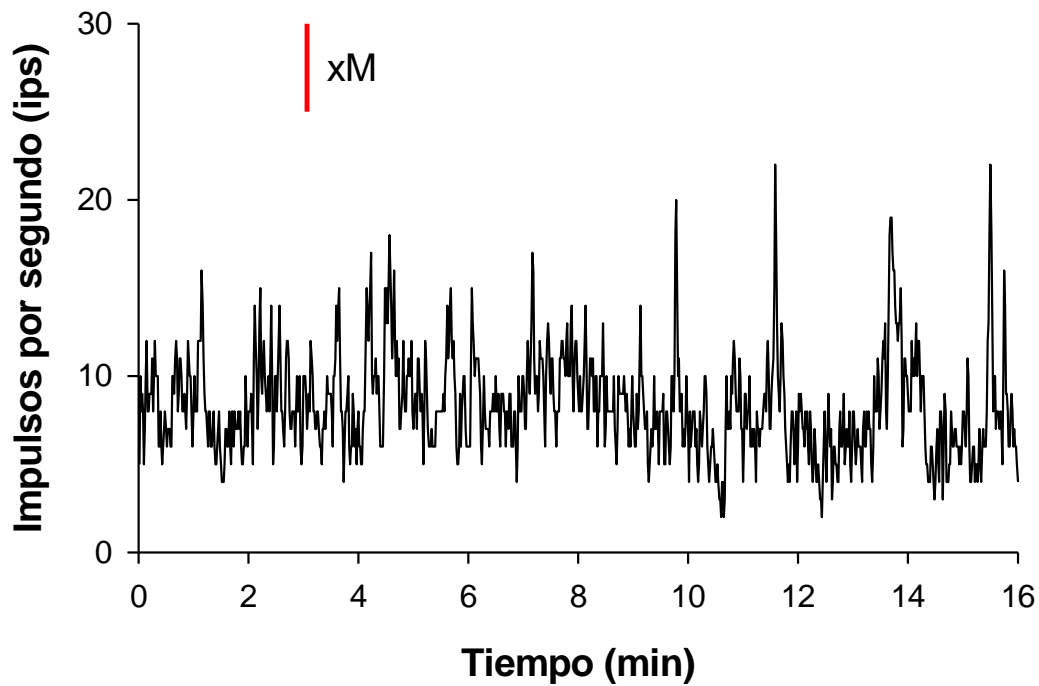


Figura 8.- En la gráfica se muestra el histograma de frecuencias, el eje “y” los impulsos por segundo (*ips*), en el eje “x” el tiempo (*min*). Este histograma se obtuvo de un registro control en el que se aplicó Solución Tyrode fosfatos (*xM*). La línea vertical roja indica el momento de la aplicación de la solución control, como se observa en la gráfica durante y después de la aplicación no se produce ningún cambio en la frecuencia de descarga.

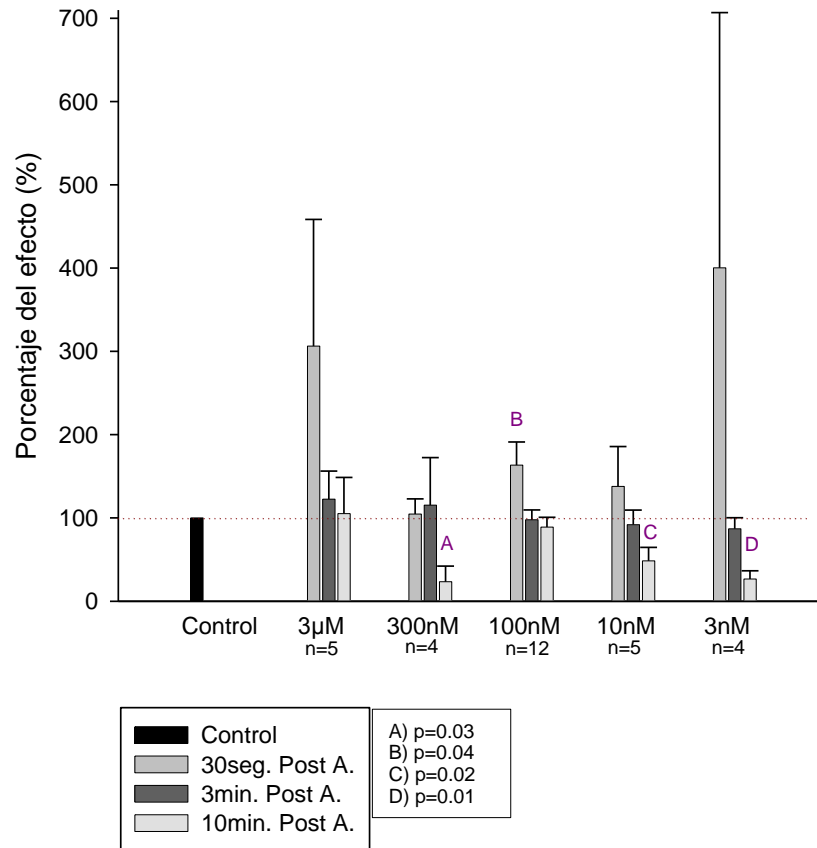


Figura 9.- En la gráfica de barras se muestra el efecto del DPDPE sobre la actividad eléctrica basal del nervio vestibular. Todos los valores fueron normalizados a porcentaje. El control (100%) se observa al inicio representado con una barra negra, 1) La primera barra en cada grupo representa el efecto evaluado a los 30 segundos de la aplicación, la segunda a los 3 minutos de la aplicación y la tercera a los 10 minutos. Por sobre la línea punteada se puede observar el porcentaje de efecto comparado con su respectivo control, las barras cuyos valores rebasan la línea punteada nos indican el incremento en los IPS. Valores por debajo nos indican una disminución. Debajo de cada grupo se muestran las diferentes concentraciones el número de experimentos realizados. 2) Las letras (A, B, C, D) señalan los grupos en los cuales se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

La figura 10 muestra un histograma de frecuencia de la actividad basal del nervio vestibular, la flecha azul señala el momento en que se aplicó 40 μ l de DPDPE a una concentración de [3nM] el efecto a esta concentración fue disminuir frecuencia de descarga hasta alcanzar casi el 0 a los 50 min. El análisis estadístico para la concentración de [3nM] nos arrojó resultados estadísticamente significativos ($P=0.01$) para la descarga basal evaluada a los 10 minutos posteriores a la aplicación del fármaco.

Para la concentración [10nM] se observó una disminución en la frecuencia de descarga basal. El análisis estadístico fue significativo a las 10 minutos posteriores a la aplicación, con una $p=0.02$, en cuanto a los valores medidos a los 30 segundos y 3 minutos no fueron estadísticamente significativos con una $p=0.43$ y $p=0.63$ respectivamente.

La aplicación del fármaco a una concentración [100nM] produjo un aumento en la frecuencia de descarga (excitador) en la mayoría de los experimentos. En algunos casos se observó un efecto bifásico (aumento y disminución de la frecuencia de descarga) como se muestra en la figura 12. Los valores analizados a los 30 segundos de la aplicación resultaron ser estadísticamente significativos con una $p=0.04$, a los 3 minutos y 10 minutos no fueron estadísticamente significativos ($p= 0.86$ y 0.37 respectivamente).

En 2 de 4 experimentos, la aplicación de DPDPE [300nM] produjo una disminución de la frecuencia de descarga basal del nervio vestibular de mamífero el análisis a los 10 minutos posterior a la aplicación fue estadísticamente significativo con un valor de $P=0.03$ y a los 30 segundos y 3 minutos posteriores a la aplicación no fue estadísticamente significativo ($p= 0.81$ en ambos casos)..

La figura 11 muestra un histograma de frecuencia de la actividad eléctrica basal del nervio vestibular, la flecha azul nos indica el momento de aplicación de DPDPE a una concentración de [3 μ M]. La aplicación de este fármaco produjo un aumento de la frecuencia de la descarga basal con respecto a su control medido a los 30 segundos posteriores a la aplicación. Este comportamiento no fue

consistente en todos los experimentos de esta concentración ya que también se pudo observar la disminución de la frecuencia de descarga como efecto de la aplicación del fármaco. Como resultado del análisis estadístico, los efectos del fármaco a esta concentración medidos a los 30 segundos ($p=0.25$), a los 3 minutos post. Ap. ($p=0.54$) ni a los 10 min post. Ap. ($p= 0.91$) posteriores a la aplicación no son estadísticamente significativos.

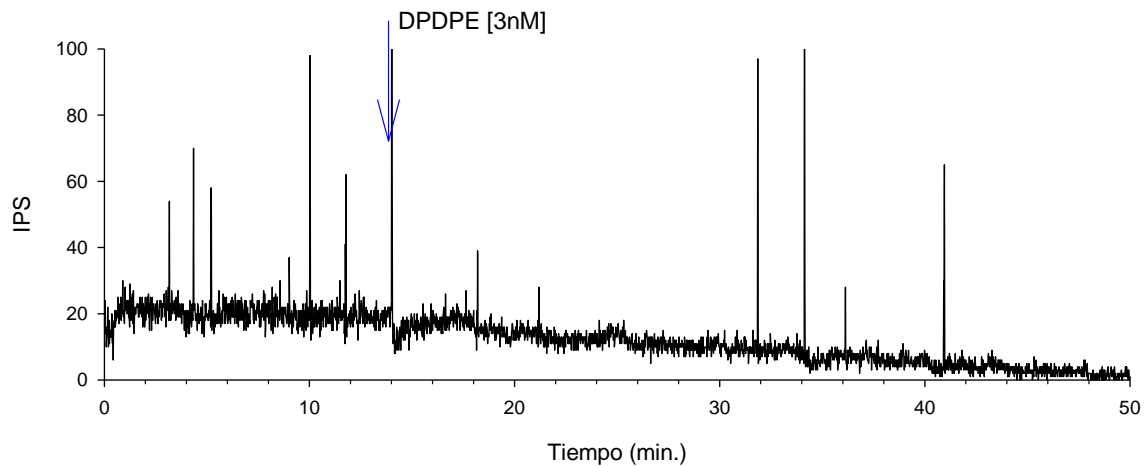


Figura 10.- En la gráfica se muestra un histograma de frecuencias de la descarga del nervio vestibular. En el eje Y se muestra la frecuencia en impulsos por segundo (IPS) contra tiempo (min.) en el eje X. La flecha azul indica el momento de la aplicación de DPDPE [3nM]; como se puede observar el efecto induce una disminución gradual de la frecuencia de descarga.

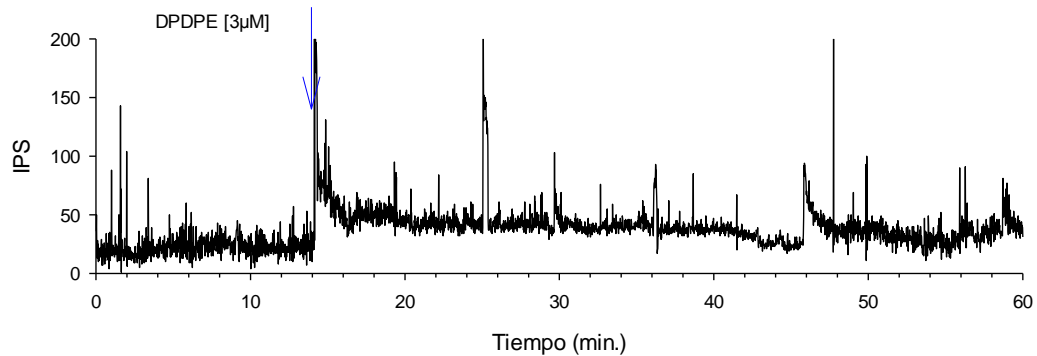


Figura 11.- En la gráfica se muestra un histograma de frecuencias de la descarga del nervio vestibular. En el eje Y se muestra la frecuencia en impulsos por segundo (IPS) contra tiempo

(min.) en el eje X. La flecha azul indica el momento de la aplicación de DPDPE [3 μ M], después de la aplicación se observa un aumento en la frecuencia de la descarga basal.

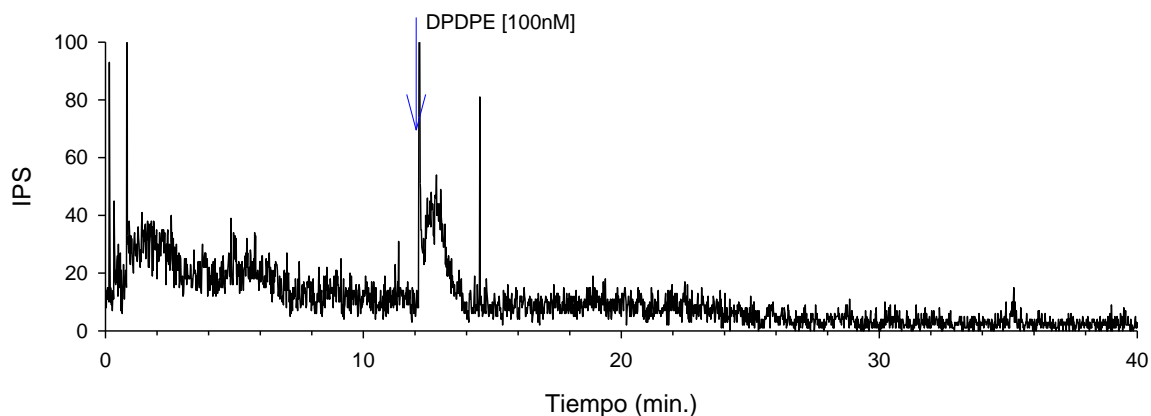


Figura 12.- En la gráfica se muestra un histograma de frecuencias de la descarga del nervio vestibular. En el eje Y se muestra la frecuencia en impulsos por segundo (IPS) contra tiempo (min.) en el eje X.. La flecha azul indica el momento de la aplicación de DPDPE [100nM], como se puede observar el efecto fue un incremento de la frecuencia de descarga basal, seguido de una disminución de la frecuencia.

La estadística no refleja las observaciones de los experimentos debido a que en algunos registros observamos efectos duales (excitador/inhibidor) o ambos. Es probable que se encuentren participando algunos otros factores que tendrían que ser evaluados o bien sea necesaria una subclasificación de los efectos para poder dar una explicación funcional de los resultados obtenidos. Si los factores o variables pueden ser identificadas o la subclasificación es posible, probablemente se pueda obtener una curva dosis-efecto que nos permita determinar la acción del fármaco.

9. Discusión

En la literatura han reportado que los receptores a opioides en el oído interno en ratas de 13 a 15 días de edad se expresan tanto en la células ciliadas como en el nervio vestibular y que estos receptores son funcionales (Popper *et al.*, 2002; Jongkamonwivat *et al.*, 2003; Phansuwan-Pujito *et al.*, 2003; Rüsç *et al.*, 1998).

Los receptores a opioides se encuentran clasificados dentro de los miembros pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales desencadenan múltiples cascadas de señalización. Entre los efectos típicos descritos para los receptores opioides se encuentra la inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje por la activación de la vía de la fosfolipasa $\text{C}\beta$, la inhibición de la adenilato ciclasa, el incremento en la conductancia de K^+ y la disminución de la liberación de neurotransmisor. Nuestra hipótesis plantea que el efecto de este fármaco tendría que observarse en la disminución de la frecuencia de descarga del nervio vestibular. En las neuronas aferentes vestibulares se expresan los canales de calcio de tipo T-, L-, N-, R- y P/Q. Seseña y colaboradores sugirieron en 2014, que los canales de calcio de tipo T-, L- y N- son regulados mediante MOR. Los tipos N-, L- y P/Q pueden ser regulados mediante DOR (Wu *et al.*, 2008) en células del ganglio de la raíz dorsal que no presentan enlace con isolectina B_4 . La señalización por segundos mensajeros puede ser bloqueada por diversos mecanismos como la actividad intrínseca ATPasa de la subunidad $\text{G}\alpha$, el posterior acoplamiento de la sub unidad $\text{G}\alpha$ -GDP y el complejo heterodimerico $\text{G}\beta\gamma$ (Dascal, 2001; Zhang, 2015) este efecto puede verse aumentado por la actividad de la proteína activadora de ATPasa o reguladoras de la señalización por proteínas G (RGS). La presencia continua del agonista desencadena un proceso de desensibilización (Allouche *et al.*, 2014) que también produce el cese de la cascada de señalización por la vía del desacoplamiento del receptor debido a la fosforilación por proteincinasa A (PKA) o la proteincinasa C (PKC). Aunque también como parte del proceso de desensibilización puede ocurrir la endocitosis del complejo GPCR por la fosforilación del extremo C- terminal que permite el acoplamiento de la maquinaria

endocítica y de arrestinas (Claing *et al.*, 2002; Varga, 2003; Charfi *et al.*, 2014). En nuestros resultados observamos una disminución en la frecuencia de descarga, probablemente debido a los mecanismos de señalización involucrados en la activación de los receptores opioides, esta disminución no es estadísticamente significativa en varios de los casos; sin embargo en 3 concentraciones a los 10 minutos de la aplicación ([300 nM], [10nM], [3nM]) los resultados son estadísticamente significativos. Un proceso de sensibilización requiere que los receptores se encuentren en una constante exposición al agonista. Charfi y colaboradores en 2013 demostraron que el DPDPE tiene un efecto agonista parcial sobre los receptores δ y que esto desencadenaba una vía de inhibición de AMP_c lo cual explicaría por qué podemos observar una disminución en la frecuencia de descarga a los 10 minutos de la aplicación del fármaco en nuestros experimentos. En las células ciliadas y el nervio aferente del vestíbulo además de los receptores a péptidos opioides endógenos, se encuentran otros receptores, así como diferentes sustancias neuroactivas como el péptido relacionado al gen de la calcitonina, endocannabinoides, óxido nítrico, histamina, sustancia P, ácido γ -aminobutírico (GABA) y ATP (Soto, 2013). Por lo que es probable que existan diferentes interacciones entre los ligando y los receptores. Liudyno y colaboradores, en 2002, estudiaron los efectos de algunos péptidos opioides sobre los receptores $\alpha 9/\alpha 10$ nicotínicos a acetilcolina ($\alpha 9/\alpha 10$ nAChRs) encontrando que el DPDPE no inhibió la corriente evocada por Ach en células ciliadas del sáculo. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Andrianov y Ryzhova en 2003, donde probaron los efectos de la Leu-Encefalina sobre la descarga basal evocada por Ach en el nervio vestibular aferente de rana (*Rana temporaria*). Primero la Leu- encefalina fue probada sola en solución normal, posteriormente en condiciones de un pre-tratamiento con atropina, un antagonista de los receptores ACh, los resultados obtenidos sugieren que la encefalina no actúa sobre los receptores en los canales semicirculares. Otros resultados obtenidos en vestíbulo de axolote sugieren que la actividad del DPDPE no es significativa, probablemente debido a que la regulación de la actividad eléctrica del nervio vestibular aferente ocurre en una forma compleja, donde los MOR regulan una respuesta excitadora a

nivel de las neuronas aferentes mientras que los KOR lo hacen de manera inhibitoria a nivel pre sináptico en la célula ciliada (Vega *et al.*, 2003).

Como en el vestíbulo, en el estudio en locus cerúleo (LC) los efectos del DPDPE permanecen inciertos, Pan y colaboradores en 2002 realizaron experimentos administrando este fármaco en neuronas de proyecciones espinales del LC, observando que existe inhibición para una población de estas células a la vez que produce excitación en otras. Llegando a la conclusión de que la activación presináptica de los DOR por DPDPE se debía probablemente a la inhibición de la liberación de GABA. Tantos diferentes efectos se podrían explicar la existencia de de 12 heterómeros opioides en células cultivadas y su papel en sistemas *in vivo* permanece aún incierto (Yekiralaa *et al.*, 2011). Los DOR pueden formar complejos heterómeros con MOR, así, utilizando ligando bivalentes cuya diana fueran los heterómeros DOR-MOR demostraron que estos ligandos tienen efectos antinociceptivos atenuado el efecto de tolerancia (Leonard *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2013).

10. Conclusión.

Los resultados obtenidos en este trabajo sobre los efectos del DPDPE en el registro de la actividad eléctrica basal del nervio aferente vestibular de mamífero, hasta el momento no permiten definir su papel en la modulación de la actividad basal, y aunque la evidencia no es suficiente para descartar su papel como neuromodulador por DOR en este sistema, da pie para continuar con el estudio y profundizar debido a que, hasta el momento, este es el primer reporte de la actividad de este fármaco en este modelo biológico. En trabajos posteriores y mediante una disección farmacológica es posible llegar a determinar el efecto de DPDPE, e incluso demostrar que en este sistema puede existir una interacción con otros receptores o la formación de heterómeros, lo que permitiría explicar con mayor claridad nuestros resultados.

REFERENCIAS

Akil H.; Meng F.; Devine D.P.; Watson S.J. (1997). Molecular and neuroanatomical properties of the endogenous opioid systems: implications for the treatment of opiate addiction. *Semin. Neurosci.* 9, 70–83.

Allouche S.; Noble F.; Marie N.(2014). Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Frontiers in pharmacology* 5. Article 280.

Andrianov G.N.; Ryzhova I.V. (2002). Lack of Evidence of an Interaction between Leu-Enkephalin and Muscarinic-Like Responses in the Frog Semicircular Canal. *Neurosignals* 12:310–314.

Angelaki D.E.; Klier E.M. and Snyder L.H. (2009). A vestibular sensation: probabilistic approaches to spatial perception. *Neuron*. Nov 25; 64(4): 448–461.

Ashitaka E.O.; Ito S.(2000). Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. *Peptides* 21: 1101–1109

Audet M.and Bouvier M. (2012). Restructuring G-Protein- Coupled Receptor Activation. *Cell* 151, Sept 28. 14-23.

Bali A.; Randhawa P.K.; Jaggi A.S. (2015). Stress and opioids: Role of opioids in modulating stress-related behavior and effect of stress on morphine conditioned place preference. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 51, 138–150

Beddell CR.; Clark RB.; Hardy GW.; Lowe LA.; Ubatuba FB.; Vane JR.; Wilkinson S. (1977). Structural requirements for opioid activity of analogues of the enkephalins. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 198:249–265.

Bhushan R.G.; Sharma S.K.; Xie Z.; Daniels D.J.; Portoghese P.S.(2004). A Bivalent Ligand (KDN-21) reveals spinal δ and κ opioid receptors are organized as heterodimers that give rise to δ_1 and κ_2 phenotypes. Selective targeting of δ - κ heterodimers. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 2969-2972.

Boom A.; Mollereau C.; Meunier J. C.; Vassart G.; Parmentier M.; Vanderhaeghen J. J. and Schiffmann N. (1999). Distribution of nociceptin and nocistatin precursor transcript in the mouse central nervous system. *Neuroscience*. Vol. 93:3, 991-1007.

Brichta A.M.; Leea H.Y.; Camp A.J.; Callister R.J.(2005). Vestibular primary afferent activity in an in vitro preparation of the mouse inner ear. *Journal of Neuroscience Methods*. Jun 30; 145(1-2):73-87.

Bronstein AM, Patel M and Arshad Q, A brief review of the clinical anatomy of the vestibular ocular connections how much do we know?. *Eye* 29, 163-170 (2015).

Broussard D.M.; Titley H.K.; Antflick J.; Hampson D.R.(2011). Motor learning in the VOR: the cerebellar component. *Exp Brain Res* 210:451–463.

Bodnar R.J. (2013). Endogenous Opiates and Behavior. *Peptides* 62, 67-136

Chávez H, Vega R, Valli P, Mira E, Benvenuti C, Guth PS, Soto E. (2001). Action mechanism of betahistine in the vestibular end organs. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 3 Suppl 66 :8-15.

Charfi I.; Nagi K.; Mnie-Filali O.; Thibault D.; Balboni G.; Schiller P.W.; Trudeau Louis-E.; Pineyro G. (2014). Ligand- and cell-dependent determinants of internalization and cAMP modulation by delta opioid receptor (DOR) agonists. *Cell Mol Life Sci*. 71(8): 1529–1546

Chung P.C.S.; Kieffer B.L. (2013). Delta opioid receptors in brain function and diseases. *Pharmacol Ther*. October 140: 112–120

Claing A.; Laporte S.A.; Caron M.G.; Lefkowitz R.J. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestin proteins. *Progress in Neurobiology* 66, 61–79

Collazo A.; Fraser SE.; Mabee PM. (1994); A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors. *Science* 15 Apr 1994: Vol. 264, Issue 5157, pp. 426-430

Comb J.; Seeburg P. H.; Adelman J.; Eiden L. y Herbert E. (1982). Primary structure of the human Met-and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*, Vol. 295, 663-667.

Collins N.; Flippen-Anderson J.L.; Haaseth R.C.; Deschamps J.R. ; George C.; Köver K. and Hruby V.J. (1996). Conformational Determinants of Agonist versus Antagonist Properties of [D-Pen², D-Pen⁵] Enkephalin (DPDPE) Analogs at Opioid Receptors. Comparison of X-ray Crystallographic Structure, Solution ¹H NMR Data, and Molecular Dynamic Simulations of [L-Ala³] DPDPE and [D-Ala³] DPDPE. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 2143-2152

Cullen K.E. (2012). The vestibular system: multimodal integration and encoding of self-motion for motor control. *Trends Neurosci.* Mar; 35(3): 185–196.

Dascal N. (2001). Ion-channel regulation by G proteins. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* Vol.12 No.9; 391-398.

Dememes D.; Mothet J.-P. and Nicolas M.-T. (2006). Cellular distribution of d-serine, serine racemase and d-amino acid oxidase in the rat vestibular sensory epithelia. *Neuroscience* 137 991–997.

Deans M.R. (2013). A Balance of Form and Function: Planar Polarity and Development of the Vestibular Maculae *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Volume 24, Issue 5, May, Pages 490–498

Evans C.J.; Keith D.E.; Morrison H.; Magendzo K.; Edwards R.H. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258:1952–1955

Eatock RA; Songer JE. (2011). Vestibular Hair Cells and Afferents: Two Channels for Head Motion Signals. *Annual review of neuroscience*.; 34:501–534.

Erspamer V.; Melchiorri P.; Falconieri-Erspamer G.; Negri L.; Corsi R.; Severini C.; Barrat D.; Simmacot M.; Kreil G. (1989). Deltorphins: A family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for 6 opioid binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86.

Fábián G. (2001). Heterotrimeric G-proteins and their role in opioid receptor function. *Acta Biol Szeged* 45(1-4):13-21.

Fields H.L.; Margolis E.B. (2015). Understanding opioid reward. *Trends in Neurosciences* 20: 1-9.

Freye E.; Levy V. (2008). Opioids in Medicine: A Comprehensive Review on the Mode of Action and the Use of Analgesics in Different Clinical Pain States. Springer. The Netherlands.

Fritsch B.; Straka H. (2014). Evolution of vertebrate mechanosensory hair cells and inner ears: toward identifying stimuli that select mutation driven altered morphologies. *J Comp Physiol A* 200: 5–18.

Furukawa T; Hayashida Y. and Matsuura S. (1978). Quantal analysis of the size of excitatory post-synaptic potentials at synapses between hair cells and afferent nerve fibres in goldfish. *Journal Physiology* 276: 211–226.

Gacek, R. (1974). Morphological aspects of the efferent vestibular system. En: Handbook of sensory physiology. Vol. VI/1 Vestibular System Berlin. (Ed.), Kornhuber, H.H. Springer-Verlag Heidelberg New York, pp 213-220.

Gacek R. (2002). Neuroanatomy of the nerves of the temporal bone. *Adv Otorhinolaryngol*; 60:12–31.

Gacel G.; Fournie-Zaluski MC.; Roques BP. (1980). D-Tyr–Ser–Gly–Phe–Leu–Thr, a highly preferential ligand for delta-opiate receptors. *FEBS Lett* 118:245–247.

Gillespie, P.G. (1995). Molecular machinery of auditory and vestibular transduction. *Current Opinion in Neurobiology*, 5, 449-455.

Goldberg, J., Smith, C. y Fernández., C. (1984). Relation between discharge regularity and responses to externally applied galvanic currents in vestibular nerve afferents of the squirrel monkey. *J. Neurophysiol.* 51: 1236-1256.

Gomes I.; Fujita W.; Gupta A.; Saldanha S. A.; Negri A.; Pinello C.E.; Eberhart C.; Roberts E.; Filizola M.; Hodder P.; Devi L.A. (2013). Identification of a $\mu\delta$ opioid receptor heteromer biased agonist with antinociceptive activity. *PNAS* 42 vol. 110: 12072–12077.

Grassi S.; Pettorossi V.E. (2001). Synaptic plasticity in the medial vestibular nuclei: role of glutamate receptors and retrograde messengers in rat brainstem slices. *Progress in Neurobiology* Volume 64, Issue 6, August, Pages 527–553.

Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2001). Control de la función motora por la corteza y el tronco encefálico. En: *Tratado de Fisiología Médica*. Décima Edición, 765-778.

Holstein G.R.; Rabbitt R.D.; Martinelli G.P.; Friedrich V.L., Jr.; Boyle R.D.; Highstein S.M. (2004). Convergence of excitatory and inhibitory hair cell transmitters shapes vestibular afferent responses. *PNAS* 101 no. 44: 15766–15771.

Highstein S.M.; Holsteinb G.R.; Manna M.A. and Rabbitta R.D. (2014). Evidence that protons act as neurotransmitters at vestibular hair cell–calyx afferent synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS*, Abril 8, vol. 111, no.14.

Hughes J; Smith TW; Kosterlitz HW; Fothergill LA; Morgan BA; Morris HR. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577–580.

Jongkamonwiwat N.P.; Phansuwan-Pujito; Sarapoke P.; Chetsawang B. ; Casalotti S.O.; Forge A.; Dodson H.; Govitrapong P. (2003). The presence of opioid receptors in rat inner ear. *Hearing Research* 181: 85-93.

Kakidani H.; Furutani Y.; Takehashi H.; Noda M.; Morimoto Y.; Hirone T.; Asai M.; Inayama S.; Nakanishi S. y Numa S. (1982). Cloning and secuence analisys of cDNA for porcine beta-neo-endorphin, dynorphin precursor. *Nature*, Vol. 298, 245-249.

Kandel, E.R.; Schawartz, J.H.; Jessell, T.M.; Siegelbaum, S.A. & Hudspeth, A.J. (2013). Principles of Neural Science. Quinta Edición, The McGraw-Hill Companies

Kieffer BL.; Befort K.; Gavériaux-Ruff C.; Hirth CG. (1992). The 6 opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Neurobiology* Vol. 89, December, pp. 12048-12052.

Kieffer B.L., Gavériaux-Ruff C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology* 66. February 285–306

Kho ST.; Lopez IA.; Evans C.; Ishiyama A.; Ishiyama G. (2006). Immunolocalization of orphanin FQ in rat cochlea. *Brain Res.* 2006 Oct 3;1113 (1):146-52.

Kreil G; Barra D; Simmaco M; Erspamer V; Erspamer GF; Negri L; Severini C; Corsi R; Melchiorri P. (1989). Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for delta opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 162:123–128.

Latridou, K., Mandalidis, D., Chronopoulos, E., Vagenas, G. & Athanasopoulos, S. (2013). Static and dynamic body balance following provocation of the visual

and vestibular systems in females with and without joint hypermobility syndrome. *Journal of Bodywork & Movement Therapies*, xx, 1e6.

Law, P. Y. (2011). "Opioid receptor signal transduction mechanism," in *The Opiate Receptors*, ed. G.W.Pasternak (New York, NY: Human Press), 195–238.

Leefmans F. J., Delpire E., Marcus D. C., Wangemann P. (2009), Capítulo 21: Cochlear and Vestibular Function and Dysfunction. En *Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System*. First Edition 2009, Mc Millian publishing solutions. 425-26.

Lenard N.R., Daniels DJ, Portoghese P. S., Roerig S. C. (2007). Absence of conditioned place preference or reinstatement with bivalent ligands containing mu-opioid receptor agonist and delta-opioid receptor antagonist pharmacophores. *Eur J Pharmacol* 566(1–3):75–82.

Liu Z., Zhou Z., Wang L., Jiang S., Wang W., Zhang R., Song L. (2015). The immunomodulation mediated by a delta-opioid receptor for [Met5]-enkephalin in oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* 49: 217–224

Lioudyno M. I., Verbitsky M., Glowatzki E., Holt J. C., Boulter J., Zadina J. E., Elgoyhen A. B., Guth P. S. (2002). The 9/10-Containing Nicotinic ACh Receptor Is Directly Modulated by Opioid Peptides, Endomorphin-1, and Dynorphin B, Proposed Efferent Cotransmitters in the Inner Ear. *Molecular and Cellular Neuroscience* 20, 695–711

Manglik A., Kruse A.C., Kobilka T. S., Thian F.S., Mathiesen J. M., Sunahara R. K., Pardo L., Weis W.I., Kobilka B. K. & Granier S. (2012). Crystal structure of the mu-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485, 321–326.

Maolood N., Meister B. (2008). Dynorphin in pro-opiomelanocortin neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience* 154: 1121–1131.

Marco J.; (1984) *Vértigo*. 1ª ed. Barcelona: Sandoz; FH. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Tomo I/1: SISTEMA NERVIOSO, Anatomía y fisiología.: Salvat 1987; p. 10

Marcotti W., Masetto S. (2010). Elementary properties of CaV1.3 Ca(2+) channels expressed in mouse cochlear inner hair cells. *J Physiol*. 2010 Jan 1;588(Pt 1):187-99

Meunier J-C (1997). Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacology*. 340:1–15.

Mitchell V., Mazzuca M., Beauvillain J.C. (1995). The fetal expression of Proenkephalin mRNAs and Met-enkephalin immunoreactivity in the hypothalamoseptal tract and adjacent hypothalamic areas of the guinea pig brain. *Developmental Brain Research* 86: 67-60.

Mosberg H.I.; Hurst R.; Hruby V.J.; Gee K.; Akiyama K.; Yamamura H.I.; Burks T.F. (1983a). Cyclic penicillamine containing enkephalin analogs display profound delta receptor selectivities. *Life Sci* 33 (Suppl 1):447–450.

Mosberg H.I.; Hurst R.; Hruby V.J.; Gee K.; Yamamura H.I.; Galligan J.J.; Burks T.F. (1983b). Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward δ opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci* 80:5871–5874.

Murali S.S.; Napier I.A.; Rycroft B.K.; Christie Mac.J.(2012). Opioid-related (ORL1) receptors are enriched in a subpopulation of sensory neurons and prolonged activation produces no functional loss of surface N-type calcium channels. *J. Physiol* 590.7:1655–1667

Nakanishi S.; Inoue A; Kita T.; Nakamura M.; Chung A C.; Cohen S. N. y Numa S. (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature*, Vol 278, 423-427.

Pan Y-Z.; Li D-P.; Chen S-R.; Pan H-L. (2002). Activation of μ -Opioid Receptors Excites Spinally Projecting Locus Coeruleus Neurons Through Inhibition of GABAergic Inputs. *J Neurophysiol* 88: 2675-2683.

Pasternak G. W. (1982). High and low affinity opioid binding sites: relationship to mu and delta sites. *Life Sci.* 31:12-13, 1303-1306.

Patneau D.K. & Mayer (1990). Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at NMDA and quisqualate receptors. *Journal of Neuroscience*, 10, 2385-2399.

Perachio, A.A.; Kevetter G.A. (1989). Identification of vestibular efferent neurons in the gerbil: Histochemical and retrograde labelling. *Exp. Brain. Res.* 78: 315–326.

Portoghese P.S.; Sultanab M.; Nagase H.; Takemoria A.E. (1992). A highly selective delta 1-opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone. *European Journal of Pharmacology*. Volume 218, Issue 1, 21 July, Pages 195–196.

Popper, P.; Christ, J.; and Wackym; P. A. (2001). Opiate receptor immunoreactivity in the vestibular epithelia in rat. *ARO abstract* 64.

Phansuwan-Pujito P.; Saleema L.; Mukda S.; Tongjaroenbuangam W.; Jutapakdeegul N.; Casalotti S.O.; Forge A.; Dodson H.; Govitrapong Piyarat. (2003). The opioid receptors in inner ear of different stages of postnatal rats. *Hearing Research* 184: 1-10.

Ray C.A.; Monahan K.D. (2004). Aging, opioid-receptor agonists and antagonists, and the vestibulosympathetic reflex in humans. *J Appl Physiol* 96: 1761–1766.

Ricci A.J.; Kachar B.; Gale J.; Van Netten S.M. (2006). Mechano-electrical transduction: New insights into old ideas. *Journal Membrane Biol.* 209, 71–88.

Richard M. van Rijn; Julia N. DeFriel; Jennifer L. Whistler. (2013). Pharmacological traits of delta opioid receptors: pitfalls or opportunities? *Psychopharmacology*. 228:1–18

Rohregger M.; Dieringer N. (2003). Postlesional vestibular reorganization improves the gain but impairs the spatial tuning of the maculo-ocular reflex in frogs. *Journal of Neurophysiology* Published 1 December Vol. 90 no. 6.

Rüsch, A.; Lysakowski, A. & Eatock, R.A. (1998). Postnatal development of type I and type II hair cells in the mouse utricle: acquisition of voltage-gated conductances and differentiated morphology. *Journal of Neuroscience* 18: 7487–501

Sasaki Y; Ambo A; Suzuki K. (1991). [D-Ala²]deltorphin II analogs with high affinity and selectivity for delta-opioid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 180:822–827.

Sasaki Y; Chiba T. (1995). Novel deltorphin heptapeptide analogs with potent delta agonist, delta antagonist, or mixed mu antagonist/delta agonist properties. *J Med Chem* 38:3995–3999.

Seo Y.-J.; Kwon M.-S.; Choi S.-S; Han E.-J.; Jung J.-S.; Choi H.-W.; Park S.-H.; Jang J.-E. and Suh H.-W. (2008). Characterization of the hypothalamic proopiomelanocortin gene and -endorphin expression in the hypothalamic arcuate nucleus of mice elicited by inflammatory pain. *Neuroscience*, 152,1054–1066

Sollars C.; Danielson P.; Joss Jean M.P; Dores R.M. (2000). Deciphering the origin of Met-enkephalin and Leu-enkephalin in Lobe-finned fish: cloning of Australian lungfish proenkephalin. *Brain Research* 874, 131–136

Soto E. & Vega R. (1988). Actions of excitatory amino acid agonists and antagonists on the primary afferents of the vestibular system of the axolotl (*Ambistoma mexicanum*). *Brain Research*, 462, 104-111.

Soto E.; Vega R.; Seseña E. (2013). Neuropharmacological basis of vestibular system disorder treatment. *Journal of Vestibular Research* 23 119–137.

Soto E. y Vega R. (2009). Enfermedad de Ménière: desde las ciencias básicas hacia la medicina clínica. Ponencia oficial del LX congreso nacional de la sociedad española de otorrinolaringología y patología cervicofacial.

Soto E. y Vega R. (1987). Turbo Pascal program for on line spike data acquisition and analysis. *J. Neurosci. Meth.* 19: 61-68.

Soto E, Vega R. (2010). Neuropharmacology of Vestibular System Disorders. *Current Neuropharmacology* 8:26-40.

Sahley T.L.; Hammond M.D.; Musiek F.E. (2013). Endogenous dynorphins, glutamate and N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptors may participate in a stress-mediated Type-I auditory neural exacerbation of tinnitus. *Brain Research* 1499: 80-108.

Seseña E.; Vega R.; Soto E. (2014). Activation of μ -opioid receptors inhibits calcium currents in the vestibular afferent neurons of the rat through a cAMP dependent mechanism. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 article 90: 1-15

Strosberg A.D. (1991). Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. *European Journal of Biochemistry.* 196:1–10.

Stein C, Schafer M, Machelska H. (2003). Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med.*; 9:1003–8

Takahashi K.; Gu Yong; May P.J.; Newlands S.D.; DeAngelis G.C. and Angelaki D.E. (2007). Multimodal coding of three-dimensional rotation and translation in area MSTd: Comparison of visual and vestibular selectivity. *The Journal of Neuroscience*, September 5, 27(36):9742–9756.

Thompson J. W. (1984). Opioid peptides. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 288(6413), 259–261.

Van Rijn R.M.; DeFriel J.N.; Whistler J.L. (2013). Pharmacological traits of delta opioid receptors: pitfalls or opportunities? *Psychopharmacology* 228:1–18.

Vega R, Soto E. (2003). Opioid receptors mediate a postsynaptic facilitation and a presynaptic inhibition at the afferent synapse of axolotl vestibular hair cells. *Neuroscience* 118(1):75-85.

Varga E.V. (2003). The molecular mechanisms of cellular tolerance to δ -opioid agonists. *Acta Biologica Hungarica* 54 (2), pp. 203–218.

Wettschureck N. and S. Offermanns (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Reviews*. 85:1159–1204.

Whittaker VP.; Michaelson IA.; Kirkland RJ. (1964). The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochemical Journal*. Feb; 90(2): 293–303.

Wittert G; Hope P; Pyle D. (1996). Tissue Distribution of Opioid Receptor Gene Expression in the Rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Jan 26; Vol. 218 (3), pp. 877-81.

Williams J.T.; Macdonald J. C.; Manzoni O.(2001). Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiological Reviews*. Vol. 81, No. 1.

Wu Z.Z.; Chen S.R.; Pan H.L. (2008). Distinct inhibition of voltage-activated Ca^{2+} channels by δ -opioid agonists in dorsal root ganglion neurons devoid of functional t-type Ca^{2+} currents. *Neuroscience* 153: 1256–1267.

Yamazaki T; Ro S; Goodman M; Chung NN; Schiller PW. (1993). A topochemical approach to explain morphiceptin bioactivity. *J Med Chem* 36:708–719.

Yekkirala A.S.; Lunzera M.M.; McCurdy C.R.; Powers M.D.; Kalyuzhny A.E.; Roerig S.C.; Portoghese P.S. (2011). N-naphthoyl- β -naltrexamine

(NNTA), a highly selective and potent activator of μ/κ -opioid heteromers. PNAS 108 no. 12: 5098–5103.

Zadina J.E.; Hackler L.; Lin-jun GE; Kastin A.J. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature* 386, 499 – 502.

Zajac JM.; Gacel G.; Petit F.; Dodey P.; Rossignol P.; Roques BP. (1983). Deltakephalin, Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Thr: a new highly potent and fully specific agonist for opiate delta-receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 111:390–397.

Zamponi G.W., Currie K.P.M. (2013). Regulations of Ca_v2 Calcium channels y G protein coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1828. 1629 –1643.

Zhang Xianjun; Stevens Raymond C. and Xu Fei. (2015). The importance of ligands for G protein-coupled receptor stability. *Trends in Biochemical Sciences*, February, Vol. 40, No. 2