

Determinación de endorfinas en LCR humano. Estudio comparativo en distintos grupos de pacientes

M. L. Laorden, F. Miralles *, M. J. Olaso * y M. M. Puig

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Murcia

(Recibido el 29 de julio de 1981)

M. L. LAORDEN, F. MIRALLES, M. J. OLASO and M. M. PUIG. *Endorphins Determination in Human CSF. A Comparative Study in Various Patient Groups.* Rev. esp. Fisiol., 38, 277-284. 1982.

Endorphin levels in human cerebrospinal fluid (CSF) have been determined by using the electrically stimulated mouse vas deferens bioassay. Endorphins were extracted by adsorption to a synthetic resin of Amberlite XAD-2 eluted with methanol, and dried under a nitrogen atmosphere.

Three different groups of patients have been studied: *a*) control subjects without a history of pain ($n = 25$), *b*) patients with acute postoperative pain after high abdominal and thoracic surgery ($n = 8$) and *c*) patients with chronic pain due to discal hernia ($n = 14$).

The endorphin levels (expressed as equivalents of Met-E) obtained from the control group were 4.36 ± 0.7 pmol/ml. In the postoperative group an endorphin decrease of 0.42 ± 0.07 pmol/ml, was found while in the chronic pain group the levels obtained were 1.39 ± 0.2 pmol/ml. Thus a significantly low level of CSF endorphins was observed in both the postoperative and the chronic pain group as compared with the controls ($p < 0.01$).

These results suggest a correlation between pain levels and endorphin concentration in CSF. However in the acute postoperative pain group other factors such as depletion of endorphins by drugs used for anesthesia or due to surgical stress cannot be excluded.

El líquido cefalorraquídeo (LCR), representa actualmente la forma más racional de determinar endorfinas en el organismo, sobre todo, si se quieren relacio-

nar los niveles de endorfinas con una función del Sistema Nervioso Central (SNC), como puede ser el dolor (15). Es difícil precisar el origen de las endorfinas que se detectan en LCR humano obtenido por punción lumbar, ya que pueden proceder de la médula, o bien de partes altas del SNC. El principal problema, respecto a

* Servicio de Anestesia y Reanimación. C. S. «Virgen de la Arrixaca». Murcia.

su determinación cuantitativa en LCR, estriba en la escasa especificidad y sensibilidad de los ensayos utilizados. Prácticamente disponemos de tres tipos de ensayos: 1) Radioinmunoensayo (RIA); 2) Unión estereoespecífica a receptores opiáceos o RRA (*Radioreceptor assay*); y 3) Bioensayo: Conducto deferente de ratón (CDR) e ileon de cobaya. Tanto el RIA como el RRA reconocen moléculas que pueden ser o no biológicamente activas. El RIA presenta, además, el posible peligro de la reactividad cruzada con moléculas estructuralmente similares, mientras que el RRA es relativamente inespecífico, puesto que se ha demostrado que moléculas no opiáceas son capaces de unirse al receptor *in vitro*. El bioensayo representa, de momento, la forma más específica para determinar la actividad opiácea *in vitro*, ya que la preparación sólo responde a la presencia de material opiáceo biológicamente activo. Entre los ensayos biológicos, el más sensible a las endorfinas es el CDR; aun así, su sensibilidad es inferior a la de los ensayos bioquímicos, hecho que constituye su principal inconveniente. Distintos autores, utilizando ensayos biológicos (CDR) y bioquímicos (RIA y RRA), han detectado la presencia de Metionina-Encefalina (Met-E) (1), B-Endorfina (13) y las fracciones I y II con actividad opiácea en LCR (15, 3).

Nosotros hemos determinado los niveles de endorfinas en LCR humano utilizando, como método de valoración, el ensayo biológico en CDR. En el presente trabajo pretendemos establecer los niveles de opiáceos endógenos en un grupo de sujetos normales y compararlo con otros grupos de pacientes que presentaban dolor agudo y crónico.

Material y métodos

Se han estudiado 47 pacientes ingresados en la Ciudad Sanitaria «Virgen de la

Arrixaca» de Murcia, cuyas edades estaban comprendidas entre 22 y 68 años. Ninguno de ellos tomaba narcótico-analgésicos ni tranquilizantes en el momento de la extracción del LCR.

Grupo control: Esta serie estaba compuesta por 25 pacientes sin historia previa de dolor, a los que se les extrajo LCR al practicar anestesia subaracnoidea y cuyos procesos patológicos (legrados uterinos y resecciones transuretrales), no se caracterizan por la presencia de dolor.

Grupo postoperatorio: Compuesto por 8 pacientes sometidos a diversas intervenciones quirúrgicas abdominales altas y torácicas, a los que se les realizó analgesia postoperatoria intratecal con morfina 2 horas después de la intervención quirúrgica, momento en el que se les extrajo el LCR. Estos pacientes presentaban dolor postoperatorio agudo; valorando el nivel del dolor mediante una escala descriptiva simple. Durante la cirugía se utilizó una técnica analgésica equilibrada a base de premedicación: Diacepam, 10 mg i.m. la noche anterior; droperidol, 2,5 mg + fentanyl, 0,05 mg; atropina, 0,75 mg i.v., inmediatamente antes de la intervención. Inducción con tiopental, 250 mg i.v. Intubación, previa facilitación con succinilcolina, 1 mg/kg i.v., manteniendo con O₂/N₂O al 70 %. Fentanyl (0,1 mg i.v. en dosis repetidas) y pancuronio (0,1 mg/kg i.v., como dosis inicial y dosis sucesivas de 2 mg i.v.).

Grupo de pacientes con hernia discal que presentaban dolor con unos 6 meses de duración, y que nosotros clasificamos como dolor crónico. Este grupo estaba compuesto por 14 pacientes, 6 mujeres y 8 hombres con una edad media de $43 \pm 2,6$ años, a los que se les extrajo LCR antes de realizar mielografía como método diagnóstico.

El LCR en todos los casos fue extraído por punción lumbar, a nivel de L₃-L₄,

en decúbito lateral entre las 13 y 15 horas. Las muestras obtenidas se mantuvieron congeladas a -20°C , hasta que fueron procesadas para determinar los niveles de endorfinas. Estas muestras se dejaron descongelar *per se* y se procedió a su ebullición a 100°C durante 5 minutos. A continuación, se acidificaron mediante la adición de 15 ml de ClH 0,1 N para desnaturalizar las proteínas; se añadieron 10 ml de una resina sintética, Amberlite XAD-2, a la que se unen las moléculas de bajo peso molecular, agitando durante 30 minutos y aspirando el sobrenadante. Se eluyó con metanol en tres etapas sucesivas: primero se emplearon 10 ml, obteniendo una recuperación del 80 % de endorfinas y, posteriormente, dos etapas sucesivas de 5 ml donde se recuperó el 10 % restante; la recuperación total fue de un 90 %. Posteriormente el metanol se evaporó en un baño a 50°C , bajo una atmósfera de nitrógeno. Estas muestras desecadas se conservaron en el frigorífico a 4°C , hasta su valoración biológica, siendo reconstruidas con 100 μl de líquido nutricio. Agitadas fuertemente (Votrex), y valoradas en el CDR, estimulado eléctricamente, usado como ensayo biológico.

Se han utilizado ratones albinos machos cepa Swis-Webster, de peso comprendido entre los 30 y 40 g. El animal fue sacrificado por dislocación cervical, se abrió la cavidad abdominal, disecándose los conductos en toda su extensión. Estos conductos una vez exprimidos con los dedos para vaciarlos de su contenido seminal, fueron colocados en un baño de órganos de 2 ml de capacidad, a una temperatura constante de 37°C . Como líquido nutricio se utilizó una solución de Krebs modificada por HENDERSON (8), con la siguiente composición: ClNa, 118 mM; ClK, 4,75 mM; Cl_2Ca , 2,5 mM; SO_4Mg , 1,19 mM; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,93 mM; glucosa, 11 mM, y CO_3HNa , 25 mM. La preparación se burbujeó continuamente con carbógeno: 95 % de O_2 y 5 % de CO_2 .

El CDR se anudó en su extremo inferior a un electrodo de platino mediante una ligadura, y el superior a un transductor fuerza-desplazamiento Stathan-Universal, acoplado a un polígrafo Beckman y éste, a su vez, a un inscriptor LKB 2210. El CDR se sometió a una tensión de reposo de 200 mg, dejándolo estabilizar entre 35 y 40 minutos. La preparación se estimuló mediante impulsos eléctricos rectangulares, a una frecuencia de 0,2 Hz, duración de 0,5 y 1 ms y voltage supramaximal mediante un estimulador Grass-SD-9 conectado a un amplificador Letica. La respuesta obtenida consiste en una serie de contracciones isométricas como registro basal de la preparación.

Una curva dosis-respuesta con Met-E (Serva), midiendo los porcentajes de inhibición producidos por las distintas concentraciones añadidas al baño, sirvió como patrón para poder interpolar las inhibiciones obtenidas con los extractos reconstruidos de LCR.

En todos los conductos se añadió previamente la DI_{50} de Met-E para poder valorar la respuesta del conducto a este péptido; si la sensibilidad era aceptable se añadía al baño 35 y 50 μl del extracto de LCR reconstruido, una vez obtenida la inhibición se añadió al baño Nx, sin lavado previo de la preparación, con el fin de obtener la inversión del efecto inhibitorio. Debido a las características especiales de la preparación, el CDR se dejaba reposar, entre las distintas muestras ensayadas sin estímulo eléctrico, durante un período de 10 minutos.

El fentanyl y el droperidol fueron añadidos a 5 ml de suero fisiológico, en un rango de 2-200 ng/ml ($5-500 \times 10^{-9}\text{ M}$) para el droperidol y de 0,1-10 ng/ml ($1-20 \times 10^{-9}\text{ M}$) para el fentanyl, y procesados siguiendo el procedimiento usado para las muestras de LCR. A estas concentraciones no se encontraron efectos significativos en el CDR, usado como ensayo biológico. Estas concentraciones son

superiores a los niveles plasmáticos encontrados a las 2 horas de la administración de 5 mg de droperidol y 0,35 mg de fentanyl a diferentes pacientes durante la anestesia. Estos niveles fueron de 2-20 ng por ml para el droperidol (4), y 0,5-1 ng/ml para el fentanyl (11, 12).

Como método estadístico se utilizó el test de Cochran y el análisis de regresión (7).

Resultados

En la tabla I se muestran los porcentajes de inhibición expresados en valores medios y el error estándar (ES) obtenidos con las distintas concentraciones de Met-E ensayadas, utilizando distintos parámetros de estimulación (0,2 Hz, 40 V, 0,5 y 1 ms). La DI_{50} fue de $3,1 \times 10^{-8}$ M \pm 0,01 utilizando una duración de estímulo de 1 ms. Para aumentar la sensibilidad de la preparación se disminuyó la duración del estímulo a 0,5 ms, obteniendo una DI_{50} de $3,7 \times 10^{-9}$ M \pm 0,20.

El efecto inhibitorio producido por la Met-E sobre las contracciones del CDR estimulado eléctricamente se muestra en la figura 1, en donde se observa cómo una concentración de 10^{-8} M produce un efecto inhibitorio de un 60 % (parte su-

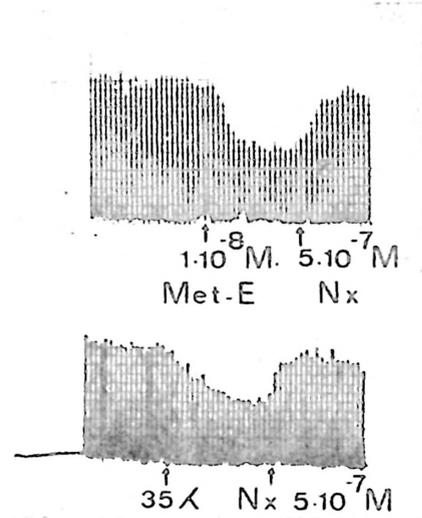


Fig. 1. Efecto inhibitorio de la Met-E sobre las concentraciones inducidas por estimulación eléctrica en CDR.

Efecto inhibitorio producido por 35 μ l de LCR de un paciente control e inversión por Nx. Las cifras representan las concentraciones finales en el baño.

Tabla I. Efecto de la MET-E sobre CDR estimulado eléctricamente.

Los resultados se expresan en valores medios \pm E.S. de los porcentajes de inhibición.

MET-E [M]	% Inhibición	
	1 ms — n = 7	0,5 ms — n = 6
2×10^{-9}	8,5 \pm 0,6	21,33 \pm 1,6
5×10^{-9}	23,1 \pm 1,1	31,00 \pm 2,3
1×10^{-8}	29,7 \pm 1,4	51,66 \pm 2,7
2×10^{-8}	39,7 \pm 1,8	60,50 \pm 2,3
5×10^{-8}	58,1 \pm 2,6	69,83 \pm 2,1
1×10^{-7}	72,8 \pm 2,0	76,83 \pm 1,8
DI_{50}	$3,1 \times 10^{-8}$ M	$3,7 \times 10^{-9}$ M
E.S.	0,01	0,20

perior). Transcurridos 2 minutos se añadió Nx 5×10^{-7} M, sin lavado previo de la preparación, invirtiéndose completamente el efecto inhibitorio producido por la Met-E. En la parte inferior se muestra cómo 35 μ l del extracto reconstruido de LCR, de un paciente del grupo control, producen un marcado efecto inhibitorio, cualitativamente semejante al producido por Met-E y cómo este efecto es invertido a la misma concentración de Nx. La inversión obtenida por Nx confirma que el material presente en el LCR es de naturaleza opiácea. La adición de Nx no consiguió la inversión completa en todos los casos estudiados, siendo necesario para ello aumentar la dosis de Nx añadida al baño.

En la tabla II se presenta el resumen de los resultados obtenidos en los distintos grupos de pacientes estudiados. Los niveles de endorfinas han sido determina-

Tabla II. Niveles de endorfinas en el LCR de pacientes control y con dolor agudo/crónico.

Grupo pacientes	Edad	Nivel endorfinas pmol/ X \pm E.S.	Niveles de endorfinas pmol/ml		% distribución pmol/ml	
			< 2	> 2	< 2	> 2
Control	47 \pm 2,1	4,36 \pm 0,7	0,79 \pm 0,1 (n = 6)	5,49 \pm 2 (n = 19)	26	74
Dolor post- operatorio	54 \pm 3,3	0,42 \pm 0,07	0,42 \pm 0,07 (n = 8)		100	
Dolor crónico	43 \pm 2,6	1,39 \pm 0,2	0,98 \pm 0,2 (n = 10)	2,40 \pm 0,1 (n = 4)	78	22

dos en todos los casos utilizando el CDR, estimulado eléctricamente con los siguientes parámetros 40 V, 0,2 Hz y 0,5 ms. El grupo control está compuesto por 11 mujeres y 14 hombres con una edad media de $47 \pm 2,1$ años. Estos pacientes, sometidos a anestesia subaracnoidea, presentaban procesos patológicos (legrados uterinos y resecciones transuretrales) que no se caracterizan por la presencia de dolor. Los niveles de material opiáceo en este grupo estaban comprendidos entre 0,3 y 16 pmol/ml. El contenido de endorfinas, que presentaban todos los pacientes estudiados, se ha distribuido en dos grupos diferentes: a) < 2 pmol/ml de equivalentes de Met-E y b) > 2 pmol/ml. Sólo 6 de los 25 pacientes estudiados en el grupo control presentaban unos niveles de endorfinas en LCR inferiores a 2 pmol/ml, mientras que los 19 pacientes restantes presentaban unos niveles superiores a 2 pmol/ml. Establecimos la frontera en 2, mediante un ajuste de cada uno de los grupos, a una curva normal de Gauss. Este estudio permite afirmar que el 26 % de los controles tiene un contenido de endorfinas inferior a 2 pmol/ml y el 74 % muestran niveles superiores a 2 pmol/ml.

El grupo postoperatorio está formado por 6 hombres y 2 mujeres con una edad media de $54 \pm 3,3$ años. Estos pacientes fueron sometidos a diversas intervenciones quirúrgicas: anastomosis, porto-cava, decorticación pleural, colecistectomía, vagotomía bilateral, toracoplastia y gastrectomía. En estos pacientes valoramos el

grado de dolor según una escala analógica descriptiva simple, cuyos valores están comprendidos entre 0 y 4, donde 0 significa ausencia de dolor, 1 dolor moderado, 2 dolor intenso, 3 dolor atroz y 4 dolor intolerable. La intensidad de dolor referida a estos pacientes fue de grado 2, excepto a un paciente sometido a gastrectomía que presentaba una intensidad de dolor de grado 1. Es importante reseñar que los niveles de material opiáceo encontrados en este grupo varían muy poco, estando comprendido entre 0,16 y 0,8 pmol/ml, siendo la media de $0,42 \pm 0,07$ pmol/ml en los 8 pacientes estudiados. El 100 % de estos pacientes está incluido en el grupo que presenta niveles de endorfinas inferiores a 2 pmol/ml.

En la figura 2 se muestra la relación existente entre el contenido de material opiáceo en LCR de pacientes con dolor crónico y el grado de dolor que presentaban. Sólo 1 de los 14 pacientes estudiados muestra dolor de grado 3; 9 pacientes presentan dolor de grado 2 y los restantes tienen un dolor de grado 1. Utilizando como método estadístico el análisis de regresión encontramos una relación estadísticamente significativa entre el grado de dolor y el contenido de endorfinas en LCR ($p < 0,01$; $r = 0,6908$). En este grupo, igual que ocurría en el grupo de pacientes postoperatorios, encontramos una disminución del contenido de material opiáceo con respecto al grupo control, obteniendo una media de $1,39 \pm 0,2$ pmol/ml en los 14 pacientes estudiados;

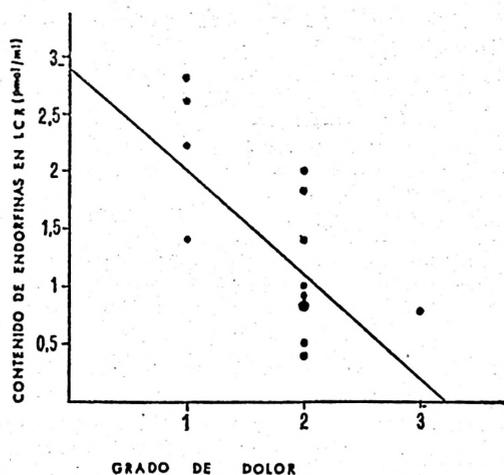


Fig. 2. Correlación entre el grado de dolor y el contenido de endorfinas en el LCR de 14 pacientes con hernia de disco.

En abscisas se representan los diferentes grados de dolor y en ordenadas el contenido de endorfinas en LCR.

10 de estos pacientes muestran un contenido de endorfinas inferior a 2 pmol/ml, con una media de $0,98 \pm 0,2$ pmol/ml.

Ante estos resultados, podemos afirmar que la mayoría de los controles se distribuyen por encima del nivel de 2 pmol/ml; mientras que los grupos de pacientes con dolor (agudo y crónico) presentan unos valores por debajo de 2 pmol/ml, a excepción de 4 pacientes con dolor crónico que mostraban niveles superiores a 2 pmol por ml.

Discusión

Los niveles de material opiáceo que encontramos en el LCR de sujetos controles son comparables a los resultados obtenidos por otros autores, así AKIL *et al.* (2) muestran unos niveles de $3,25 \pm 1,14$ pmol/ml en LCR de sujetos controles, usando como método de valoración la unión de receptores y el ensayo biológico. En estudios anteriores WAHLSTRÖM *et al.*

(16) dividen los péptidos opiáceos contenidos en el LCR en dos fracciones (I y II) y sugieren que la fracción II es similar a la Met-E. Los niveles de la fracción II en el LCR de sujetos controles fue del orden de $2,5 \pm 0,3$ pmol/ml, usando como método de valoración la unión al receptor (13). Más recientemente FURUI *et al.* (5), en un estudio realizado en 30 pacientes, observan que cuando el LCR se obtiene por punción lumbar, los niveles de material opiáceo son del orden de $4,0 \pm 1,0$ pmol/ml equivalentes de Met-E ($n = 20$), mientras que, si el LCR se obtiene directamente del ventrículo, los niveles descienden, siendo del orden de $1,1 \pm 0,3$ pmol/ml equivalentes de Met-E ($n = 10$), lo que confirma que cuando el LCR se obtiene por punción lumbar, las endorfinas pueden proceder de la médula o de partes altas del SNC. Estos últimos autores emplean como método de valoración la unión al receptor, obteniendo unos valores promedio de $2,6 \pm 1,0$ pmol/ml equivalentes de Met-E, en un estudio realizado en 4 pacientes controles de los que se obtuvo el LCR por punción lumbar.

AKIL *et al.* (2) señalan que los niveles de endorfinas en el LCR de pacientes con dolor fueron más bajos que los obtenidos en sujetos controles, cuyo LCR fue obtenido por punción lumbar, mientras que el LCR de pacientes con dolor se obtuvo directamente del ventrículo, y hay que tener en cuenta que el material opiáceo no está uniformemente distribuido en el LCR, igual que ocurre con el ácido homovanílico (metabolito de la dopamina) y 5 hidroxiindolacético (metabolito de la serotonina) (6, 9, 14).

ALMAY *et al.* (3) confirman que los pacientes con dolor crónico presentan una clara disminución de endorfinas en LCR con respecto al grupo control. En un estudio realizado en 20 pacientes con dolor orgánico obtienen unos valores promedio de $0,60 \pm 0,14$ pmol/ml equivalentes de Met-E.

En nuestro estudio, ambos grupos de pacientes con dolor crónico y con dolor agudo muestran una disminución de los niveles de endorfinas con respecto al grupo control, siendo esta disminución mucho más marcada en el grupo de pacientes con dolor postoperatorio agudo. Estos resultados son de difícil interpretación, debido al posible efecto de los distintos fármacos utilizados durante la anestesia quirúrgica, sobre el contenido de endorfinas a nivel del SNC. Sin embargo, parece que los niveles bajos no eran debidos a la interferencia de droperidol o fentanyl en el ensayo. Por otra parte, la presencia de estos fármacos en las muestras de LCR podría potenciar los efectos de las endorfinas en el bioensayo, dando como resultado un falso aumento de la concentración de endorfinas respecto al grupo control, que no ha recibido ninguno de los dos fármacos. El hecho de que los valores encontrados en el grupo de pacientes postoperatorios es marcadamente más bajo que en el grupo control, descarta que la presencia de ambos fármacos influya en los niveles de material opiáceo obtenidos; a esto podemos añadir que el procedimiento usado en este trabajo para la extracción de endorfinas no es eficiente para la extracción y recuperación del fentanyl y del droperidol. Sin embargo, es posible que la disminución de endorfinas encontradas en el grupo de pacientes postoperatorios esté en relación, más que con un síndrome doloroso agudo, con una depleción de los sistemas endorfinérgicos durante la anestesia.

Resumen

Se determina el contenido de material opiáceo en el líquido cefalorraquídeo (LCR) humano, utilizando como ensayo biológico el conducto deferente de ratón estimulado eléctricamente. El material opiáceo fue extraído mediante su adsorción a una resina sintética Amberlite XAD-2 y posterior elución con metanol. El estudio se realiza en tres grupos diferen-

tes de pacientes: a) sujetos control sin historia de dolor (n = 25), b) pacientes sometidos a cirugía abdominal alta y torácica que presentaban dolor postoperatorio agudo (n = 8) y c) pacientes con dolor crónico por hernia de disco (n = 14).

Los niveles de endorfinas (expresados como equivalentes de Met-E) obtenidos en el grupo control fueron de $4,36 \pm 0,7$ pmol/ml; disminuyendo significativamente ($p < 0,01$) tanto en el grupo de pacientes postoperatorios ($0,42 \pm 0,07$ pmol/ml) como en el grupo de pacientes con dolor crónico ($1,39 \pm 0,2$ pmol/ml).

Estos resultados sugieren una relación entre los niveles de dolor y la concentración de endorfinas en LCR; sin embargo, en el grupo de pacientes postoperatorios con dolor agudo, no pueden ser excluidos otros factores tales como la depleción de endorfinas por los fármacos usados durante la anestesia y el stress quirúrgico.

Bibliografía

1. AKIL, H., RICHARDSON, D. E., HUGHES, J. y BARCHAS, J. D.: *Science*, 201, 463-465, 1978.
2. AKIL, H., WATSON, S. J., SULLIVAN, S. y BARCHAS, J. D.: *Life Sci.*, 23, 121-126, 1978.
3. ALMAY, B. G. L., JOHANSSON, F., VON KNORRING, L., TERENIUS, L. y WAHLSTRÖM, A.: *Pain*, 5, 153-162, 1978.
4. CRESSMAN, W. A., PLOSTNIEKS, J. y JOHNSON, P. C.: *Anesthesiology*, 38, 363-369, 1973.
5. FURUI, T., KAGEYAMA, N., HAGA, T., ICHIYAMA, A. y FUKUSHIMA, M.: *Pain*, 9, 63-72, 1980.
6. GERBODE, F. A. y BOWERS, M. B.: *J. Neurochem.*, 15, 1053-1055, 1968.
7. GREMY, F. y SALMON, D.: En «Bases statistiques». Ed. Dunod, París, 1969.
8. HENDERSON, G.: HUGHES, J. y KOSTERLITZ, H. W.: *Br. J. Pharmacol.*, 45, 764-766, 1973.
9. JAKUPCEVIC, M., LACKOVIC, Z., STEFOSKI, D. y BULAT, M.: *J. Neurol. Sci.*, 31, 165-171, 1977.

10. LINDSTROM, L. H., WIDERLOV, E. y GUNNE, L. M.: *Acta Psychiat. Scand.*, 57, 153-164, 1978.
11. McCLAIN, D. A. y HUG, C. C.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 28, 106-114, 1980.
12. MURPHY, M. R., OLSON, W. A. y HUG, C. C.: *Anesthesiology*, 50, 13-19, 1979.
13. SARNE, Y., AZOV, R. y WEISSMAN, B. A.: *Brain Res.*, 151, 399-403, 1978.
14. SIEVER, L., KRAEMER, H., SACK, R., ANGIN, P., BERGER, P., ZARCONI, V., BARCHAS, J. y BRODIE, H. K. H.: *Dis. Nerv. Syst.*, 36, 13-16, 1975.
15. TEREINIUS, L. y WAHLSTRÖM, A.: *Life Sci.*, 16, 1759-1764, 1975.
16. WAHLSTRÖM, A., JOHANSSON, L. y TEREINIUS, L.: En «Opiates and endogenous opioid peptides» (H. W. Kosterlitz, ed.). Elsevier, Amsterdam, 1976.