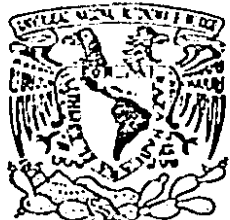


01965

3 29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA

EFFECTO DE LA NALOXONA SOBRE NEURONAS IDENTIFICADAS
DE CARACOL HELIX ASPERSA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN PSICOBIOLOGIA

P r e s e n t a :

RAFAEL GUTIERREZ AGUILAR



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION	
I. Antecedentes del trabajo de tesis.....	2
II. Efectos de los opioides a nivel celular.....	3
III. Efectos de la naloxona a nivel celular.....	6
IV. Estudios de los efectos de los antagonistas y antagonistas de los opioides en moluscos.....	9
Planteamiento del problema.....	11
Hipótesis.....	12
TRABAJO EXPERIMENTAL	
Material y método.....	13
Procedimiento.....	15
RESULTADOS	
I. Caracterización de la respuesta. Mapeo.....	18
II. Efecto de diferentes concentraciones de calcio extracelular en la respuesta a la naloxona.....	27
III. Efecto de la naloxona sobre el potencial de acción.....	34
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	52

RESUMEN

En esta tesis se estudia el efecto que produce la naloxona, a dosis que antagonizan el efecto de los opioides en mamíferos, sobre el potencial de membrana y en la forma y duración del potencial de acción de células identificadas del caracol terrestre *Helix aspersa* in vitro. Asimismo, se estudia el efecto de este antagonista opioide bajo diferentes condiciones iónicas extracelulares.

El efecto excitatorio de la naloxona sobre diferentes procesos fisiológicos ha sido explicado por su acción antagonista sobre el efecto inhibitorio que producen los opioides. Sin embargo, también ha sido propuesto que la naloxona tiene un efecto excitatorio per se. En este sentido, se ha propuesto que la naloxona favorece el flujo de calcio al interior de la célula. Con estos antecedentes, se decidió estudiar: a) qué efectos produce la naloxona sobre la actividad eléctrica de neuronas sensibles y neuronas no sensibles a los agonistas opioides, y b) determinar el efecto de diferentes concentraciones de calcio extracelular sobre su acción en estos dos tipos de células.

Los resultados muestran que la naloxona, disuelta en el baño de perfusión, a concentraciones que son capaces de antagonizar la depresión que producen los opioides o provocar un síndrome de abstinencia ($< 1 \mu M$) es capaz de modificar el potencial de reposo. Despolariza las células F8, F31, F61 y F82, hiperpolariza E4, E8, E9, E13 y E16 y no produce efectos sobre el potencial de membrana en las células F2, F77 y F78. Asimismo, los agonistas opioides (morfina, encefalina y fentanil) hiperpolarizaron las células F31 y F82 y despolarizaron la E8 y no tuvieron efecto sobre las neuronas F2, F77, F78 y F79. Además de la despolarización, la naloxona alteró el patrón de disparo. El lavado de la preparación revirtió la despolarización e inclusive, produjo que estas células se hiperpolarizaran. Se muestra que esta hiperpolarización es producida en presencia de K^+ y es dependiente de la concentración extracelular de Ca^{++} .

La sustitución equimolar de Ca^{++} por Co^{++} evitó la acción de la naloxona. Además, la naloxona produjo consistentemente un incremento de la duración del potencial de acción y la disminución de la amplitud de la posthiperpolarización. Asimismo, produjo un incremento de la duración de los potenciales de acción cálcicos, tanto en las células que se despolarizaron con su aplicación como en las que no lo hicieron.

Se concluye que la naloxona, efectivamente, tiene acciones no solamente relacionadas con su capacidad de antagonizar la acción de los agonistas opioides, sino que produce efectos por sí misma. Los resultados sugieren que es capaz de producir la activación de la entrada de calcio a la célula y de disminuir una corriente de potasio dependiente de calcio, misma de la que depende la repolarización del potencial de acción.

INTRODUCCION

I. Antecedentes

Varios trabajos han descrito que la naloxona es capaz de incrementar los reflejos espinales (Godfarb y Hu, 1976; Catley y col., 1983; Suzuki y col., 1987), de favorecer la aparición e incrementar la duración de crisis convulsivas generalizadas (Corcoran y Wada, 1979; Hardy y col., 1980; Snyder y col., 1981) y producir un aumento en la amplitud y la aparición de componentes tardíos en los potenciales evocados (Velasco y col., 1984).

En nuestro laboratorio hemos confirmado y ampliado estos datos mostrando que la naloxona facilita el kindling amigdalino condensado (Fernández-Guardiola y col., 1986, 1988) y que es capaz, por sí sola, de producir crisis convulsivas electrográficas en gatos en preparación *encéphale isolé* (Fernández-Guardiola y col., 1988). Asimismo, hemos mostrado que aplicada en dosis repetidas de 8 mg/kg cada 15 minutos, es capaz de producir crisis convulsivas generalizadas en gatos íntegros en libre movimiento (Pellicer y col. 1988). Con experimentos en la médula espinal, Fernández-Guardiola y col. (1984, 1986) han mostrado que la naloxona es capaz de aumentar el efecto acumulativo de la potenciación posttetánica y evitar la habituación a estímulos sensoriales o deshabituación si ésta ya se había producido. Asimismo, se ha encontrado un aumento de los reflejos espinales mono y polisinápticos (Fernández

Guardiola y col., 1982, 1986), así como un aumento de los componentes tardíos de los potenciales evocados visuales (Rocha y col., 1987).

Estos hallazgos sugieren, de manera indirecta, un efecto inhibitorio de los opioides endógenos sobre la epileptogénesis y su participación en la modulación de la información sensorial aferente.

II. Efectos de los agonistas opioides a nivel celular

Este efecto inhibitorio o modulador de los opioides puede asociarse a la disminución de la frecuencia de descarga de las neuronas en casi todas las regiones del sistema nervioso central de mamíferos (North y Williams, 1985). Esta disminución es debida a la activación de una conductancia de la membrana al potasio como resultado de un incremento del Ca^{++} intracelular (Duggan y North, 1983). Estos efectos han sido descritos para los opioides agonistas μ y δ en tanto que los agonistas κ actúan disminuyendo la conductancia al Ca^{++} (North, 1986; Werz y Macdonald, 1983; Macdonald y Werz, 1986).

En un estudio con fijación de voltaje en neuronas del locus coeruleus, North y Williams (1985) demostraron que el aumento de la conductancia de la membrana al K^+ , inducido por opioides, es independiente del potencial de membrana. A potenciales menos negativos de -50 mV, se produce una reducción de la conductancia que ocurre con la despolarización. Esta

puede deberse a una sensibilidad de la corriente de K^+ (I_K) al voltaje o a que exista otra corriente saliente a este nivel de polarización que la antagonice. Esta corriente depende de la entrada de Ca^{++} que ocurre a voltajes menores de -60 mV. De acuerdo con ésto, cualquier corriente saliente inducida por opioides no sólo hiperpolarizaría directamente la membrana, sino que la llevaría a un potencial en el que la corriente entrante de Ca^{++} es decrementada ayudando aún más a la hiperpolarización. Sin embargo, la inhibición de la entrada de Ca^{++} se asoció siempre a un incremento de la conductancia al K^+ .

Estos mismos autores mostraron que los opioides no redujeron las corrientes de Ca^{++} después de que el incremento de la conductancia al K^+ (g_K) fue bloqueado por Cs intracelular, quinidina o Ba extracelular, bloqueadores específicos de I_K . Esta última observación, junto con experimentos en los que se administró EGTA intracelularmente y en los que se indujo una reducción de la hiperpolarización producida por opioides son fuerte evidencia de que la conductancia al K^+ producida por opioides depende de la disponibilidad de Ca^{++} intracelular.

Por otro lado, Barker y col. (1978), en un estudio en neuronas espinales en cultivo, encontraron que la leucina-encefalina actúa elevando el umbral para generar el potencial de acción o bajando la resistencia de entrada de la membrana. North y Williams (1985) muestran además, que la

efectividad de la entrada sináptica excitatoria se ve reducida no sólo porque los opioides alejan a la membrana del umbral de disparo, sino que la reducen porque la llevan a un potencial en el que los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) activan una corriente saliente de K^+ que se inactiva con una constante de tiempo de 130 ms, por lo que esta corriente se opone a corrientes entrantes de Na^+ . Como resultado de esto, la amplitud de los PPE no se incrementa con la hiperpolarización y su duración se reduce.

Las evidencias experimentales que demuestran que los opioides producen una reducción en la entrada de Ca^{++} producen también una reducción en la cantidad de neurotransmisor que se libera (Duggan y North, 1983; Bixby y Spitzer, 1983) o inclusive, una reducción de la disponibilidad del neurotransmisor (Tremblay, 1974).

Además de los posibles efectos presinápticos de los opioides, también han sido descritos efectos postsinápticos (Bradley y Dray, 1974; Yaksh, 1981). La transmisión colinérgica es bloqueada por morfina a altas concentraciones (Waziri, 1976). Tremblay y col. (1974) mostraron que la morfina tiene un efecto anticolinesterásico y Duggan y col., (1976) proponen que los opioides son agonistas al receptor nicotínico en las células de Renshaw.

Varios autores (Jurna y Grossman, 1977; Mudge y col., 1979; Zieglgänsberger y Tulloch, 1979; Yaksh, 1981; Johnson, 1980) han descrito diversas acciones de los opioides a nivel

celular, pero ninguno ha observado cambios en la resistencia de entrada de la membrana. Sin embargo, Parler y col. (1978) encontraron que la leucina-encefalina decremonta la resistencia de entrada de neuronas espinales en cultivo. Este efecto, junto con la elevación del umbral para generar un potencial de acción dan cuenta, según este autor, de la depresión de la excitabilidad producida por los opioides.

III. Efecto de la naloxona a nivel celular

La naloxona es un antagonista opioide que, se une a los receptores μ , δ y κ con distintas afinidades, siendo la más alta para el μ . Como antagonista, no produce un efecto al unirse con el receptor. En este sentido, el análisis de sus efectos ha sido centrado en su acción antagonica o protectora de aquéllos que producen los opioides a nivel celular, pluricelular o conductual. Prueban, de manera indirecta, la acción de los opioides endógenos en determinados procesos fisiológicos por medio de su bloqueo. Así pues, la reversión de los efectos de los opioides por la aplicación de naloxona es indicativa de la especificidad de la acción de ésta sobre receptores a opioides (Zieglgänsberger y Tulloch, 1979).

Durante los últimos años, los efectos farmacológicos no opioides de la naloxona han recibido especial atención (ver Sawynok y col., 1979). Ereuker y col. (1976) y Dingledine y col. (1978) demostraron que la naloxona se une al receptor del

GABA, bloqueando su efecto. Además, Cupello e Hydén (1981) reportaron que la met 5-encefalina actúa bloqueando el transporte de GABA a través de la membrana, lo que permite que este neurotransmisor inhibitorio actúe más tiempo sobre su receptor. El pretratamiento de la preparación con naloxona bloquea el efecto del péptido opioide, pero la acción del antagonista por sí sólo, no tuvo ningún efecto sobre el transporte del GABA.

Asimismo, Gruol y col. (1980) demostraron que las encefalinas potencian el efecto inhibitorio del GABA y la naloxona revierte este efecto. Más aún, estos efectos de la naloxona también se observan con el isómero (+) de la naloxona y concluyen que ésta se une al receptor de GABA de manera competitiva y que tiene baja afinidad ya que se necesitaron concentraciones muy altas. Barker y col. (1978) mostraron que la leucina-encefalina decrementa la amplitud de respuestas al GABA y al glutamato en neuronas espinales en cultivo.

A nivel celular, ha sido demostrado el antagonismo de la naloxona sobre los efectos producidos por los opioides, en varias preparaciones. La morfina excita las células de Renshaw y este efecto es antagonizado por naloxona, aunque no se ha descartado si se debe a un efecto sobre la liberación presináptica de acetilcolina (Davies, 1976; Duggan y col., 1976).

La naloxona incrementa la frecuencia de disparo espontánea de células de las capas IV, V y VI de la médula espinal

(Ziegglänsberger y Tulloch, 1979; Yaksh y Rudy, 1978), así como la evocada por estimulación de aferentes cutáneas y por estimulación táctil (Pellicer y col., 1986).

Johnson y North (1980) mostraron que la naloxona (1 μM) produce una despolarización (8 mV promedio) en neuronas del plexo mientérico, incubadas en morfina durante 24 hrs y propone que esta despolarización subyace a la liberación de ACh.

Por otro lado, existen varios reportes de que la naloxona produce acciones inespecíficas sobre la membrana neuronal. Recientemente, Chvátal y col., (1987) han mostrado que los opioides y la naloxona pueden estar afectando la actividad de la bomba Na-K. Las encefalinas y la morfina (1 μM a 100 μM) decrementaron los cambios en la concentración de K^+ extracelular ($[\text{K}]_o$) producidos por estimulación tetánica, decrementaron el nivel máximo de $[\text{K}]_o$ y aceleraron el curso temporal de la redistribución de K^+ medido con la técnica de electrodos sensibles a este ión. La naloxona, que actuó de forma similar a la ouabaina, incrementó el nivel máximo de $[\text{K}]_o$ producido por estimulación tetanizante, disminuyó la reabsorción de K^+ y bloqueó la caída de K^+ producida por la estimulación. Así, la naloxona (100 μM) decrementó la actividad de la ATPasa Na-K cerca del 90%.

Otros efectos inespecíficos, son los que se relacionan con una alteración en el flujo de Ca^{++} a través de la membrana. Así, se ha sugerido que la acción de la naloxona depende de la disponibilidad de Ca^{++} extracelular en *vas deferens* de cobayo

(que no tiene receptores a opioides; Ramaswamy y col., 1979) y médula espinal de rana (Suzuki y col., 1987).

Sin embargo, varios autores niegan la posibilidad de una apertura de una conductancia al Ca^{++} durante la exposición del tejido a la naloxona (Frazier y col., en axón gigante de calamar, 1973; Shimahara e Icard-Liepkalns, en neuroblastoma, 1987; Rackó y col., en hipófisis, 1987), sin que por esto se objete la dependencia de la naloxona del calcio extracelular.

IV. Estudios de los efectos de agonistas y antagonistas de los opioides en moluscos

Las ventajas experimentales de las preparaciones de moluscos en cuanto al estudio de la biofísica de membranas y del análisis celular del comportamiento son las siguientes: Primero, muchas especies de moluscos tienen neuronas gigantes, cuyos somas y axones son lo suficientemente grandes para ser penetradas fácilmente hasta con 3 microelectrodos para registro, estimulación y fijación de voltaje o corriente. Estas células, por tanto, son ideales para estudiar los fenómenos de membrana que subyacen a las señales bioeléctricas neuronales. Una segunda ventaja se refiere al sistema nervioso relativamente sencillo que tienen los moluscos, lo que permite la identificación anatómica y fisiológica de las neuronas.

El caracol terrestre *Helix aspersa* ha sido bien estudiado y su sistema nervioso ha sido caracterizado anatómicamente,

electrofisiológica y farmacológicamente (Sakharov y Salanki, 1979; Kerkut y col., 1975).

La presencia de opioides endógenos en varias especies de moluscos ha sido demostrada por varios autores (Stefano y Catapane, 1978; Greenberg y Price, 1983; Stefano y Leung, 1984) y se ha asociado a procesos de termorregulación (Kavaliers y Hirst, 1984), conducta alimenticia (Kavaliers y Hirst, 1987), modulación de la información nociceptiva (Greenberg y Price, 1983) y de neuromodulación (Tremblay, 1974; Waziri, 1976; Stefano y Catapane, 1978; Aiello y col., 1986).

Sin embargo, son pocos los estudios electrofisiológicos reportados sobre la acción de agonistas y antagonistas de estas sustancias en moluscos (ver Tremblay, 1974; Waziri, 1976; Stefano y col., 1979; Stefano y col., 1980) quizá porque se necesitan concentraciones muy altas (más de $1 \mu\text{M}$) para obtener efectos (Duggan y North, 1985), los cuales pueden resultar inespecíficos.

En este sentido, Ku y col. (1986) y Yongsiri y col. (1987) mostraron que la aplicación de varios péptidos, incluyendo la metionina-encefalina a una concentración de $100 \mu\text{M}$, no producen cambios en la actividad de neuronas identificadas del caracol gigante africano *Achatina fulica* Ferussac. Sin embargo, Stefano y col. (1979) mostraron que la aplicación de metionina-encefalina ($1.7 \mu\text{M}$) directamente en el soma, inhibe la actividad en salvas de neuronas de *Helix pomatia*. Esta inhibición se refiere a la desaparición de espigas, pero si se

observan las ondas lentas que subyacen a la actividad en salvas. El pretratamiento de la célula con naloxona evitó los efectos de la metionina-enkefalina. La naloxona (1.5 μM) no produjo cambios por sí sola en la actividad neuronal.

Asimismo, estos autores mostraron que la naloxona (1.5 μM) es capaz de bloquear el efecto de la dopamina en una neurona con actividad en salvas y propone que tiene un efecto antagonista específico en receptores a dopamina, similar al del haloperidol.

En otro estudio Stefano y col. (1980) muestran que la aplicación de metionina-enkefalina y morfina en neuronas con actividad marcapaso de *Helix pomatia* produjo un incremento considerable de la frecuencia de descarga (de 300 a 700%). Este efecto excitatorio fue bloqueado por naloxona, sin embargo este fármaco no produjo ningún efecto por sí sólo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Partiendo de las evidencias que muestran la reversión de los efectos de los opioides por la naloxona en lo que respecta a: 1) los efectos en el nivel de polarización de las neuronas, 2) aquéllos en los que se sugiere un efecto presináptico o postsináptico y 3) aquéllos efectos sobre la acción de otros neurotransmisores, puede apreciarse que hacen falta datos de la acción que la naloxona produce por sí misma, es decir, no en el sentido del antagonismo de un efecto producido por la

aplicación exógena de un opioide.

En este sentido hacen falta evidencias experimentales que diluciden los cambios iónicos que acompañan determinados niveles de polarización de la membrana tras la aplicación de la naloxona y que den cuenta de los cambios de excitabilidad. Con estos antecedentes se decidió explorar los cambios de polarización producidos por los agonistas y antagonistas de los opioides endógenos en un sistema bien conocido, el sistema nervioso del caracol terrestre *Helix aspersa*.

HIPOTESIS:

1. Si conforme a las evidencias existentes, los moluscos, en especial el caracol terrestre *Helix aspersa*, poseen un sistema peptidérgico opioide, los agonistas opioides deberán producir una hiperpolarización de las neuronas que contengan receptores a éstos y la naloxona deberá provocar un aumento de la frecuencia de disparo, acción similar a la que se observa en las neuronas de mamíferos.

2. Ha sido mostrado que para que la naloxona ejerza su acción, debe existir Ca^{++} extracelular. Por tanto, la naloxona deberá modificar los componentes del potencial de acción, dependientes de calcio; y la sustitución de Ca^{++} en el Ringer, por Co^{++} o Mg^{++} , deberá evitar su acción.

3. De la misma manera, la evocación de potenciales cálcicos, por el bloqueo de corrientes de Na^+ y de K^+ , permitirá observar el efecto de la naloxona sobre las características morfológicas y temporales del mismo y, en caso de haberlo, se podrá proponer su acción sobre alguna corriente de calcio.

4. Ya que como antagonista, la naloxona no debe desencadenar ninguna respuesta fisiológica *per se*, la modificación de los parámetros mencionados en los puntos anteriores, permitirá proponer un efecto de ésta diferente al bloqueo de la acción inhibitoria de los opioides.

TRABAJO EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODO

Se usaron caracoles terrestres *Helix aspersa* adultos. Se disecaron los ganglios subesofágicos y se fijaron en una cámara de acrílico con una capa de Silgard en un baño con una solución Ringer-caracol.

Una vez fijados, se disecaron los ganglios visceral (D) y parietales izquierdo (E) y derecho (F) (según el mapa de Kerkut y col., 1975). Las capas de tejido conectivo que los cubren, se removieron con microtijeras, bajo observación microscópica. En los casos en los que no se pudo remover la última capa de conectivo por encontrarse muy adherida, se aplicó Proteasa tipo

IV durante 25 minutos, y luego se lavó la preparación. Las drogas utilizadas se disolvieron a la concentración deseada en diferentes tipos de Ringer (ver Tabla I) y se hicieron circular continuamente con una bomba polistáltica o por gravedad a una velocidad de 1 ml/min. Estas fueron: hidrocioruro de naloxona (Endo), fentanil (Fentanest, Jansen) y metionina-encefalina (Sigma).

TABLA I

Composición de los diferentes tipos de Ringer-caracol* [mM]

	R.-calcio alto (R.-Ca ⁺⁺ -alto)	R.-calcio bajo (R.-Ca ⁺⁺ -bajo)	R. cobalto (R.-Co ⁺⁺)	R.TEA
NaCl	75	100	75 6 100	--
KCl	2.5	4	2.5 6 4	--
CaCl ₂	10	2	--	20
MgCl ₂	5	3	5 6 3	--
CoCl ₂	--	--	10 6 2	--
TEA	--	--	----	70
4-AP	--	--	----	5
CsCl	--	--	----	5
Glucosa	5	5	5	5
HEPES	5	5	5	5

ajustados a pH 7.5

TEA = Tetraetilamonio; 4-AP = 4, aminopiridina

* en lo sucesivo, se denominarán los diferentes tipos de Ringer como aparecen entre paréntesis en el encabezado de esta tabla.

Los diferentes tipos de Ringer fueron seleccionados de entre los reportados por otros autores, de acuerdo a sus concentraciones de calcio. Se escogió, para R.-Ca⁺⁺-alto [Ca⁺⁺]_o = 10 mM, el descrito por Lux y Hofmeier (1982); para R.-Ca⁺⁺-bajo [Ca⁺⁺]_o = 2 mM, el descrito por Alvarez-Leefmans y col. (1981) y R.-TEA, con el que se obtienen potenciales cálcicos (cuya corriente -entrante- despolarizante es acarreada sólo por Ca⁺⁺, ya que esta solución no contiene Na⁺) a partir del trabajo de Cruzblanca y col. (1988).

PROCEDIMIENTO

Se llevó a cabo el registro de potencial intracelular con un electrómetro WPI (modelo KS700) usando electrodos llenos de KCl 3M (salvo cuando se usó Ringer-TEA, con el que se usaron electrodos llenos de CsCl 3M) de 8 a 20 MΩ de resistencia, colocados bajo observación microscópica (Microscopio Leitz, Laborlux II, con dos micromanipuladores). Se colocó un electrodo de referencia de Ag/AgCl en el baño, conectado a la tierra del electrómetro. La estimulación eléctrica transmembranal, se aplicó con un estimulador (Grass S88), por medio del mismo electrodo de registro. La señal se grabó en cinta magnética (FM) para su análisis posterior. Las células fueron identificadas de acuerdo a su posición, basándose en el mapa de Kerkut y col. (1975) (fig. 1) y de acuerdo a su actividad eléctrica.

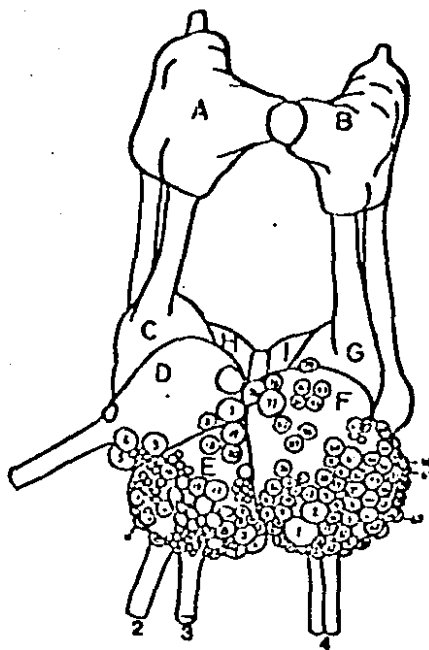


FIGURA 1. Esquema de los ganglios subesofágicos del caracol *Helix aspersa* (de Kerkut y col., 1975).

Los experimentos en los que se dudó de la correcta identificación de las células fueron descartados y no se incluyen en este estudio. En todos los casos, la actividad se registró por lo menos durante 20 minutos antes de hacer cualquier manipulación farmacológica. Asimismo, en los experimentos en los que se cambió la composición iónica extracelular durante el registro, se dejó la preparación con perfusión continua durante por lo menos 30 minutos antes de

probar cualquier droga para asegurarse de la estabilidad de la actividad celular. Para evitar posibles efectos residuales de las sustancias utilizadas, una vez perfundida la preparación con alguna de ellas, se utilizó otra preparación para otro experimento.

Con una célula en registro estable, se llevaron a cabo las siguientes manipulaciones experimentales:

a) se registró la actividad espontánea y se determinaron los cambios del potencial de membrana en reposo, del patrón de disparo, de la excitabilidad y de la resistencia de entrada por medio de la técnica de fijación de corriente.

b) Se determinaron la forma y duración del potencial de acción.

c) Se determinaron los cambios en los mismos parámetros tras la aplicación de metionina encefalina, fentanil y naloxona.

d) Se observó el efecto de los agonistas y antagonistas opioides sobre los mismos parámetros, bajo condiciones iónicas extracelulares diferentes. Es decir, en R. Ca^{++} -alto, R.- Ca^{++} -bajo, R.- Co^{++} y R. TEA. La señal grabada fue graficada en papel, con diferentes bases de tiempo, para poder observar los cambios del potencial de membrana y de la forma, amplitud y duración del potencial de acción.

RESULTADOS

I. CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA. MAPEO.

Con el objeto de identificar las neuronas sensibles a los agonistas opioides, a la naloxona o a ambos, se llevó a cabo el registro intracelular, con la preparación en un baño de R.-Ca⁺⁺-alto debido a que, si como se ha descrito, la naloxona produce acciones no específicas dependientes de calcio, los efectos de ésta pudieran hacerse más evidentes.

a) Neuronas que se despolarizaron con la aplicación de naloxona.

La neurona F31 es una célula con actividad marcapaso, es decir, actividad rítmica autogenerada. El potencial de membrana (Em) de esta neurona osciló entre -30 y -35 mV.

La naloxona (300 nM) produjo una despolarización al bañar la preparación ($\Delta V_m = 6 \pm 2$ mV; $n = 6$) que se estabilizó en 20 segundos aproximadamente. La frecuencia y el patrón de descarga fueron alterados, volviéndose irregular éste último y estos efectos permanecieron durante la perfusión con Ringer-naloxona. Los efectos de la perfusión de naloxona 1 μ M fueron similares a los de 300 nM. El lavado de la preparación con Ringer control revirtió el efecto despolarizante de la naloxona e hiperpolarizó a la célula en todos los casos 4-6 mV por abajo

de su E_m control (fig. 2). La recuperación de la actividad marcapaso fue observada en sólo dos experimentos, hasta después de 40 minutos de perfusión continua.

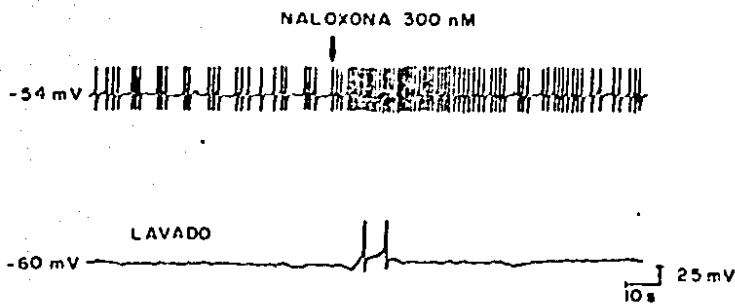


FIGURA 2. Efecto de la naloxona (300 nM) sobre la actividad espontánea de la célula F31 con $[Ca^{++}]_o = 10$ mM. Nótese el aumento de la frecuencia de disparo con la aplicación de la naloxona. La célula queda hiperpolarizada después de lavar la preparación.

La neurona F82, también con actividad marcapaso, se despolarizó con la naloxona ($\Delta mV = 10.4$ mV; $n = 4$) y el patrón de descarga también fue alterado. En todos los casos, el lavado de la preparación, produjo una hiperpolarización de 3-4 mV por abajo de su E_m control (40 ± 5 mV) (fig. 3). En un sólo experimento, se observó que la naloxona produjo una hiperpolarización que fue reversible por el lavado.

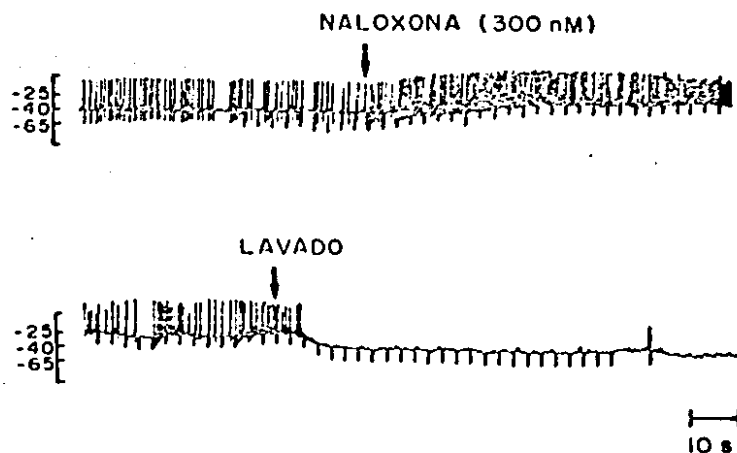


FIGURA 3. Efecto de la naloxona (300 nM) sobre la actividad espontánea de la neurona F82 en $[Ca^{++}]_o = 10mM$. Obsérvese la despolarización producida por la naloxona así como la hiperpolarización al lavar la preparación. La resistencia de entrada en situación control fue de 105.75 M Ω ; con naloxona, 63.5 M Ω y lavado 85 M Ω .

En estas dos células, F31 y F82, tanto la metionina encefalina como el fentanil produjeron hiperpolarización durante su perfusión (fig. 4).

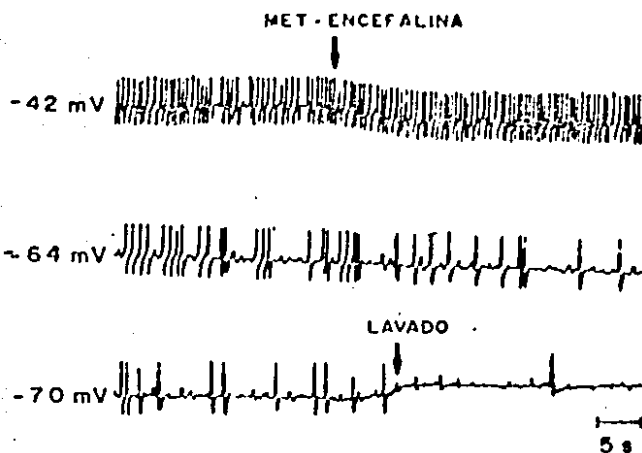


FIGURA 4. Efecto de la metionina-encefalina (300 nM) sobre la actividad espontánea de la célula F31 en $[Ca^{++}]_0 = 10$ mM.

Otras neuronas marcapaso que presentaron la misma respuesta a la naloxona fueron: F61 (n = 3) y F8 (n = 3). Sin embargo, en éstas no se probó el efecto de los agonistas opioides.

b) Neuronas que se hiperpolarizaron con la aplicación de naloxona.

La célula E8 se hiperpolarizó con la aplicación de naloxona y el fentanil la despolarizó; asimismo, las células E16, E4 y E13 se hiperpolarizaron, pero no se probaron los agonistas opioides. Al igual que con la naloxona, el lavado de la preparación revirtió el efecto del antagonista sobre E_m pero no se revirtió el efecto sobre el patrón de descarga,

permaneciendo alterado (fig. 5).

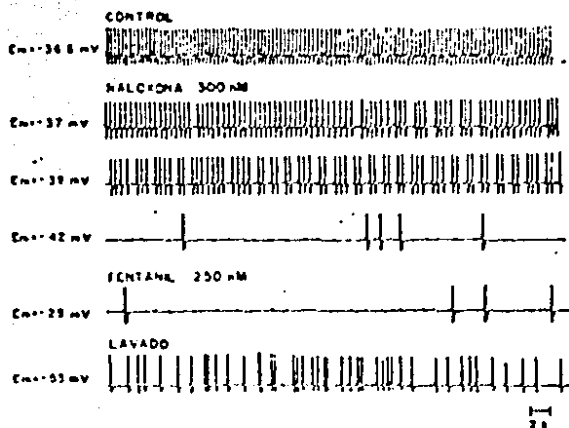


FIGURA 5. Efecto de la naloxona (300 nM) y el fentanil (250 nM) sobre la actividad espontánea de la célula EB en $[Ca^{2+}]_0 = 10$ mM. Los tres primeros registros son sucesivos, el cuarto 10 segundos después.

c) Neuronas que no fueron sensibles a la aplicación de naloxona.

Las células F2, F77, F78 y F79, todas con actividad irregular (potenciales de acción esporádicos y PFSE o FFSI) no modificaron su potencial de membrana con la aplicación de naloxona ($n = 7$) ni con la de los agonistas opioides ($n = 3$). Sin embargo, la aplicación de naloxona (1 μ M) produjo un incremento en el número y amplitud de los PFSE en las neuronas F77 y F78 que disminuyó con el lavado (fig. 6).

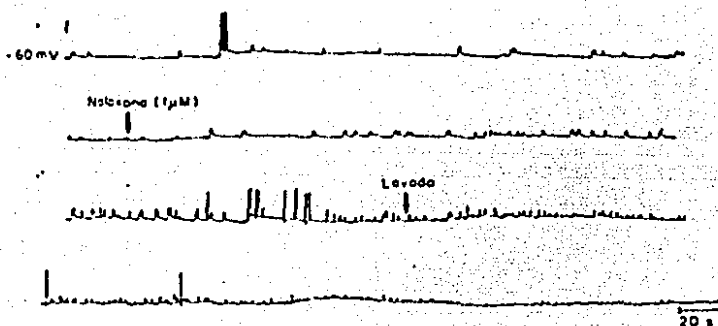


FIGURA 6. Efecto de la naloxona ($1 \mu\text{M}$) sobre la actividad espontánea de la célula F77 con $[\text{Ca}^{+2}]_0 = 10 \text{ mM}$. Nótese un aumento en el número de los FPSE durante la perfusión de la preparación con naloxona. El lavado revirtió este efecto.

d) Otros efectos de la naloxona.

En las neuronas E12, E13 F14 y F15, el potencial de membrana presentó una oscilación lenta ($.5/\text{seg.}$) de $\pm 3 \text{ mV}$ durante los primeros 20-30 segundos de la perfusión con naloxona y después se estabilizó. El lavado de la preparación con Ringer control no produjo ningún efecto.

e) Efectos de la naloxona sobre la respuesta neuronal a la estimulación eléctrica.

En todos los casos, la naloxona produjo un efecto que es consistente con un aumento de la excitabilidad neuronal, así como una disminución o abolición de la adaptación de la frecuencia de disparo (figs. 7 y 8).

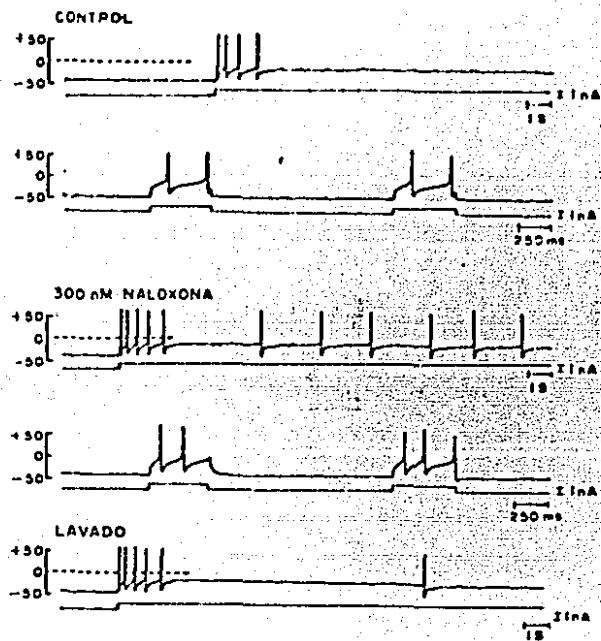


FIGURA 7. Efecto de la naloxona (300 nM) sobre la respuesta de la célula F61 a la estimulación eléctrica. Nótese cómo la naloxona evita la adaptación ante una despolarización larga y disminuye el intervalo interespigas, produciendo un mayor número de potenciales por cada estímulo, lo que es consistente con un aumento de la excitabilidad. Estos efectos fueron revertidos con el lavado.

De la misma manera, fue posible observar que la naloxona produjo consistentemente una disminución de la resistencia de entrada de 35 - 40 % en las neuronas F31 y F82 ($n = 5$) (ver fig. 3) y un aumento de 30 - 35 % en las neuronas F2, F77 y F79 ($n = 4$) (fig. 9). Estos cambios fueron parcialmente revertidos con el lavado. La tabla II presenta un resumen de la dirección de los cambios de potencial de membrana que produjeron los

agonistas opioides y la naloxona.

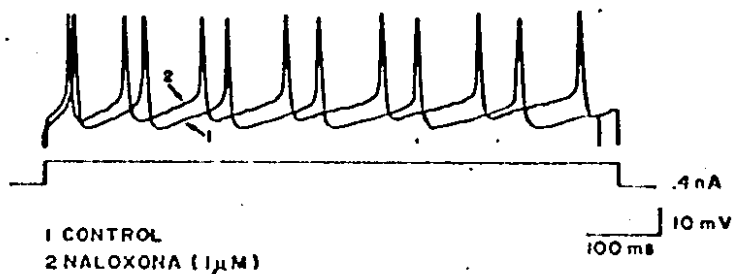


FIGURA 8. Efecto de la naloxona sobre la respuesta de la célula F31 a la estimulación eléctrica. Nótese la disminución del intervalo interespigas con la aplicación del antagonista.

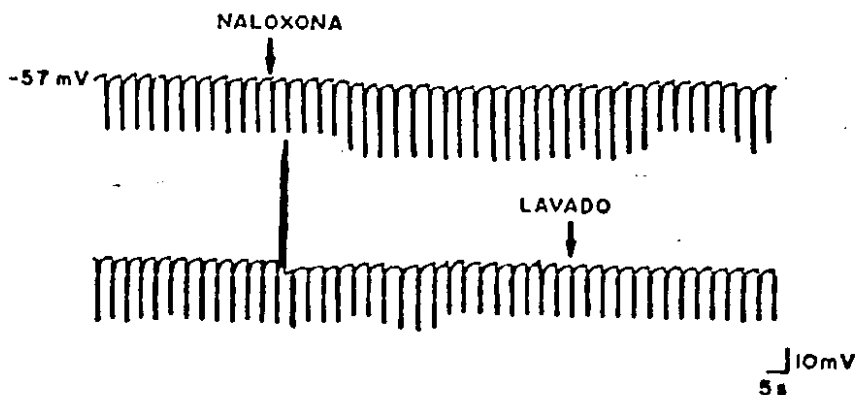


FIGURA 9. Efecto de la naloxona sobre la célula F77. Obsérvese un aumento de la resistencia de entrada durante la perfusión con naloxona y su reversión por el lavado de la preparación. Resistencia de entrada control 70.76 M Ω ; naloxona 100.64 M Ω y lavado 94.16 M Ω .

TABLA II

Efecto de la naloxona, la metionina encefalina y el fentanil en el potencial de membrana de neuronas identificadas de caracol *Helix aspersa*.

NEURONA	n	Em	EFECTO NALOXONA			EFECTO OPIOIDES		EFECTO NALOXONA SOBRE Rm
			300nM	600nM	1µM	Fentanil	Met-enc	
E4	3	-31 a -26	H	-	H	-	-	-
EB	3	-35 a -38	H	-	-	D	-	-
E16	2	-36 a -32	H	-	-	-	O	-
E13	1	-36 a -41	H	-	-	-	-	-
F2	4	-52 ± 3	O	-	O	O	-	↑
FB	3	-43 a -47	D	-	D	-	-	-
F31	11	-30 a -35	D	D	D	H	H	↓
F61	3	-46 a -42	D	-	D	-	-	-
F77	3	-40 ± 3	O	-	O	O	O	↑
F78	3	-47 ± 3	O	-	O	O	-	↑
F79	3	-32 ± 3	O	-	O	O	-	-
FB2	5	-37 a -43	D	-	D	H	H	↓

D = Despolarización; H = Hiperpolarización; O = sin efecto; - = no se probó

II. Efecto de diferentes concentraciones de calcio extracelular en la respuesta a la naloxona.

Como se mencionó anteriormente, existen evidencias que sugieren que la acción de la naloxona depende de la disponibilidad de calcio extracelular $[Ca^{++}]_o$ (Ramaswamy y col., 1979; Suzuki y col., 1987). Para explorar esta dependencia, se llevaron a cabo registros intracelulares de las neuronas F8, F31 y F82 que se despolarizaron durante la aplicación de naloxona (las dos últimas se hiperpolarizaron con la aplicación de agonistas opioides), con diferentes concentraciones extracelulares de calcio.

Se comparó el efecto de la naloxona en R.- Ca^{++} -alto $[Ca^{++}]_o = 10$ mM con R.- Ca^{++} -bajo $[Ca^{++}]_o = 2$ mM, R.- Co^{++} (sustitución equimolar de Ca^{++} por Co^{++}) y R.-TEA ($[Ca^{++}]_o = 20$ mM; $[Na^+]_o = 0$; $[K^+]_o = 0$).

Con R.- Ca^{++} -bajo control, la frecuencia de disparo de las células F31 y F82 fue mayor y su potencial de membrana más negativo que con R.- Ca^{++} -alto (ver Tabla III). En estas condiciones, la aplicación de naloxona produjo una despolarización de 6.5 ± 3.1 mV ($n = 6$) y no produjo ningún efecto aparente sobre E_m en 2 experimentos. El patrón de descarga fue alterado en todos los experimentos y se observó un aumento de la frecuencia de descarga, aún en los dos en los que E_m no se alteró. En estas condiciones iónicas extracelulares, el lavado de la preparación revirtió el efecto de la naloxona

sobre la actividad marcapaso, es decir, las neuronas recuperaron su patrón de descarga y en ningún caso se observó una hiperpolarización al perfundir el Ringer control (fig. 10). El efecto sobre el potencial de membrana se revirtió en 3 experimentos, parcialmente en otros 3 y en un experimento no se hizo el recambio.

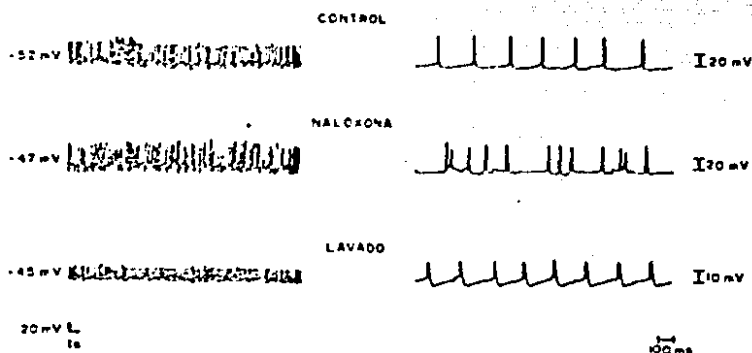


FIGURA 10 Efecto de la naloxona sobre la actividad espontánea de la célula F31 en $[Ca^{++}]_0 = 2$ mM. Nótese cómo la naloxona modifica el patrón de disparo y el lavado revierte este efecto.

La figura 11 muestra cómo la naloxona evita la acomodación de la membrana y provoca la disminución del intervalo interespiigas.

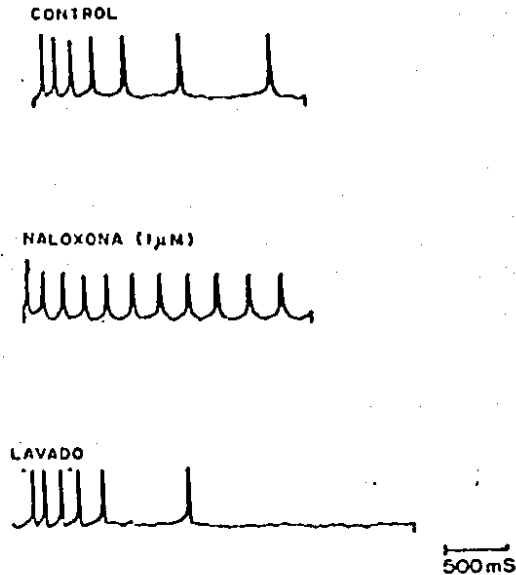


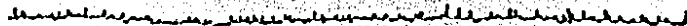
FIGURA 11. Efecto de la naloxona ($1 \mu\text{M}$) en la respuesta de la célula F31 a la estimulación eléctrica. Nótese cómo disminuye el intervalo interespigas y la reversión de este efecto con el lavado.

Las neuronas en las que no se observó efecto de la naloxona en R.- Ca^{++} -alto, no modificaron su potencial de membrana ($n = 4$) en R.- Ca^{++} -bajo al perfundir la naloxona, sin embargo aumentó el número de FPSE. El lavado produjo que los FPSE disminuyeran en número y la perfusión de R.- Co^{++} hizo que desaparecieran (fig. 12).

CONTROL



NALOXONA (300 nM)



LAVADO



RINGER - COBALTO



FIGURA 12. Efecto de la naloxona ($1 \mu\text{M}$) sobre la actividad espontánea de la célula F77 con $[\text{Ca}^{++}]_o = 2 \text{ mM}$. La naloxona aumenta el número de PFSE, el lavado lo disminuye y el R.- Co^{++} produce su desaparición.

En los experimentos en los que se registró con R.- Co^{++} , la disección se llevó a cabo en Ringer normal y después de penetrar una célula y mantener el registro estable, se hizo el recambio. Después de 20 minutos de perfusión continua con R.- Co^{++} se aplicó la naloxona. Se llevaron a cabo 4 registros en estas condiciones, 3 en la célula F31 y uno en la F82. El cambio de R.- Ca^{++} a R.- Co^{++} produjo, en todos los casos, que la célula se hiperpolarizara $7 \pm 2 \text{ mV}$ y en sólo una de ellas se observaron potenciales de acción espontáneos. La aplicación de la naloxona en ningún caso provocó cambios en E_m (fig 13).

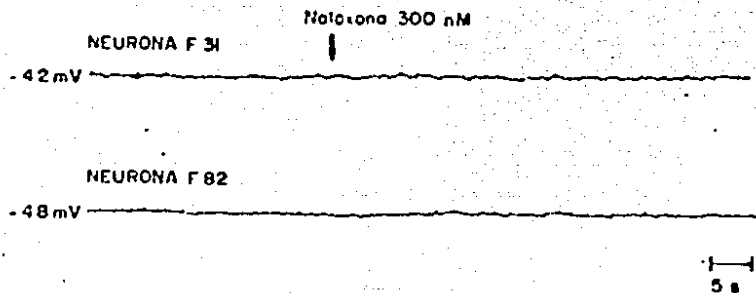


FIGURA 13. Efecto de la naloxona en las neuronas F31 y F82 en R.-Co⁺⁺. Nótese cómo la naloxona no produce la despolarización que se observa en presencia de calcio extracelular.

TABLA III

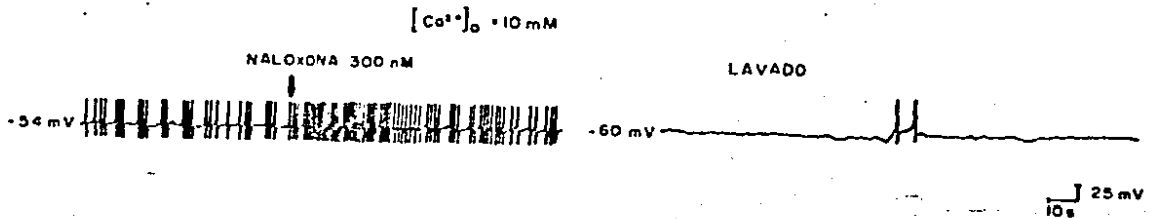
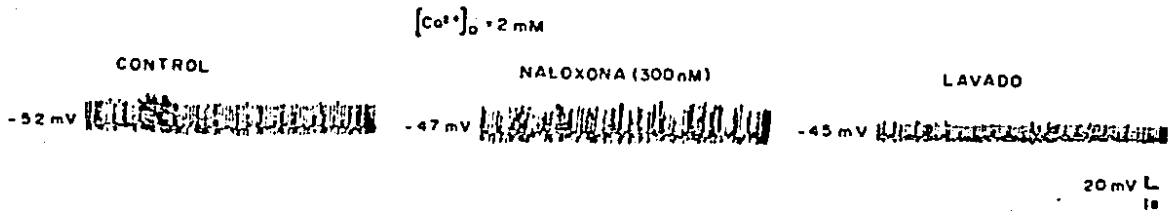
Cambios sobre Em producidos por la naloxona en las células F31 y F82

	R.-Ca ⁺⁺ -alto	R.-Ca ⁺⁺ -bajo	R.-Co ⁺⁺
+ΔVm	8.66 ± 4.7 (n = 10)	6.5 ± 3 (n = 6)	0 (n = 5)
ΔVm = 0	1	2	5
-ΔVm	7 ± 1 (n = 2)	0	0

En R.-TEA, la naloxona produjo una despolarización de 4.6 ± .8 mV en 3 experimentos con dos neuronas sensibles tanto a los agonistas opioides como a la naloxona (F31 y F82). En estos

experimentos, el lavado con R.-TEA control no modificó el potencial de membrana, es decir, no se produjo la hiperpolarización. Las figuras 14 y 15 muestran los efectos de la naloxona en las diferentes concentraciones extracelulares de calcio.

Como control, se llevaron a cabo dos experimentos similares en la neurona F77 -no sensible a la naloxona- y no hubo modificación del Em al perfundir la naloxona ni al lavar la preparación.



$[Ca^{++}]_o = 20 \text{ mM}; [K]_o = 0$ TEA = 70; 4-AP = 5 mM

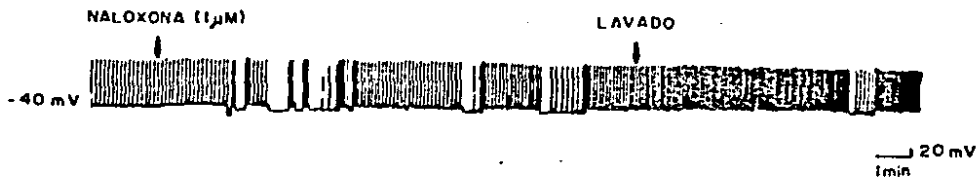
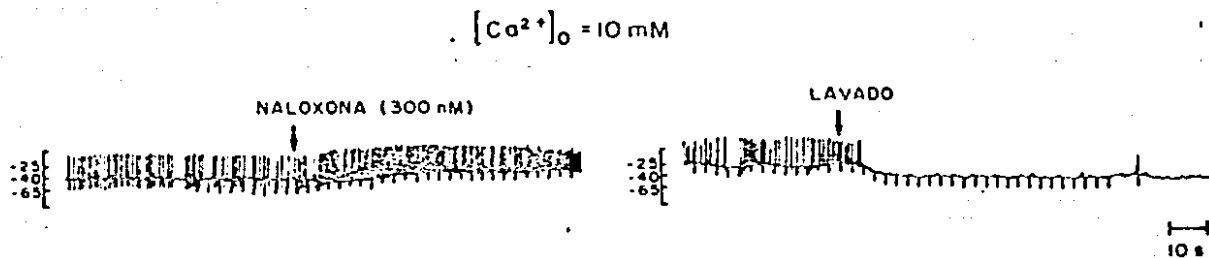


FIGURA 14. Efecto de la naloxona en diferentes concentraciones extracelulares de calcio en la actividad espontánea de la célula F31 y su recuperación. Nótese que en $[Ca^{++}]_o = 2$ mM y $[K^+]_o = 4$ mM como en R.-TEA, el lavado no produce la hiperpolarización que se observa en $[Ca^{++}]_o = 10$ mM.



$[Ca^{++}]_o = 20$ mM; $[K]_o = 0$; TEA = 70 mM 4-AP = 5 mM

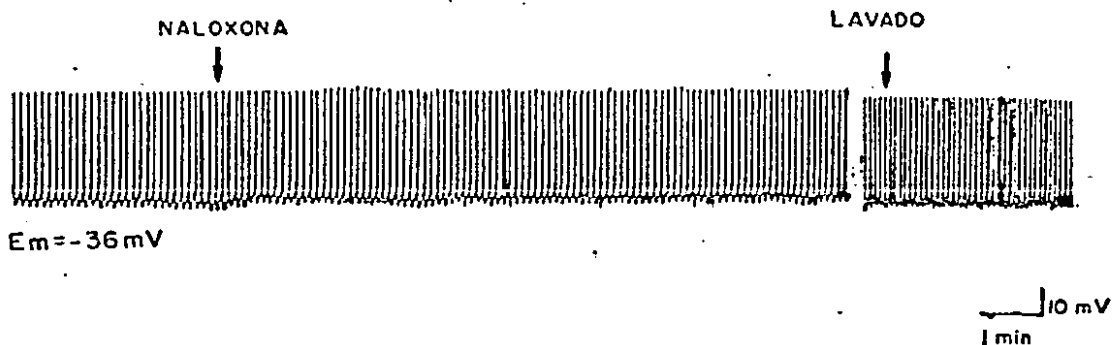


FIGURA 15. Efecto de la naloxona en diferentes concentraciones extracelulares de calcio en la actividad espontánea de la célula F82. Nótese que en $[Ca^{++}]_o = 2$ mM y $[K^+]_o = 4$ mM como en $[Ca^{++}]_o = 20$ mM y $[K^+]_o = 0$, el lavado no produce la hiperpolarización que se observa en $[Ca^{++}]_o = 10$ mM.

III. Efecto de la naloxona sobre el potencial de acción.

Debido a que los experimentos anteriores muestran diferentes efectos de la naloxona de acuerdo a las distintas concentraciones extracelulares de calcio y a la presencia o ausencia de potasio, se decidió analizar las modificaciones en el potencial de acción de acuerdo a estas condiciones.

El análisis del potencial de acción se llevó a cabo superponiendo los potenciales de acción registrados durante la perfusión de Ringer control, R. naloxona y lavado (R. control), haciéndolos coincidir en la fase de subida del potencial en la que presentaban igual pendiente.

En R.-Ca⁺⁺-alto, la aplicación de naloxona produjo un incremento en la duración del potencial de acción a consecuencia de una disminución de la pendiente de la repolarización del mismo. Además, la amplitud de la posthiperpolarización (PH) fue disminuida consistentemente. Las figuras (16 y 17) muestran estos efectos en las neuronas F31 y F82.

Debido a que el lavado de la preparación produjo una hiperpolarización y a que este análisis se llevó a cabo en potenciales de acción espontáneos, no se presentan en estas figuras los efectos del lavado. Sin embargo, en la figura 18 se muestra un potencial de acción evocado por un pulso despolarizante, en donde se observa que el lavado revierte la acción de la naloxona sobre la PH.

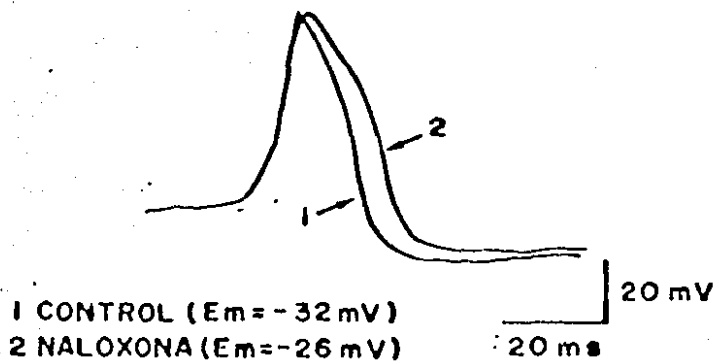


FIGURA 16. Efecto de la naloxona (300 nM) sobre el potencial de acción de la neurona F31 en $[Ca^{++}]_o = 10 \text{ mM}$.

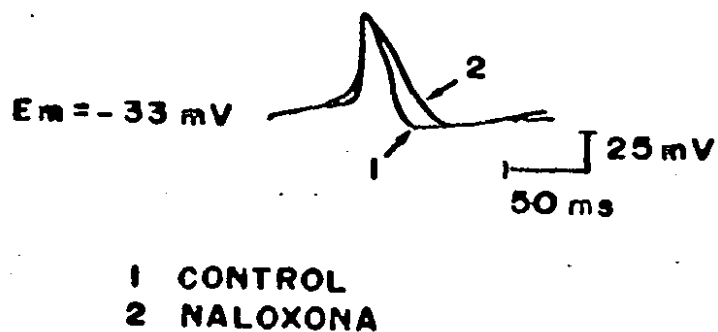


FIGURA 17. Efecto de la naloxona (300 nM) sobre el potencial de acción de la neurona F82 en $[Ca^{++}]_o = 10 \text{ mM}$.

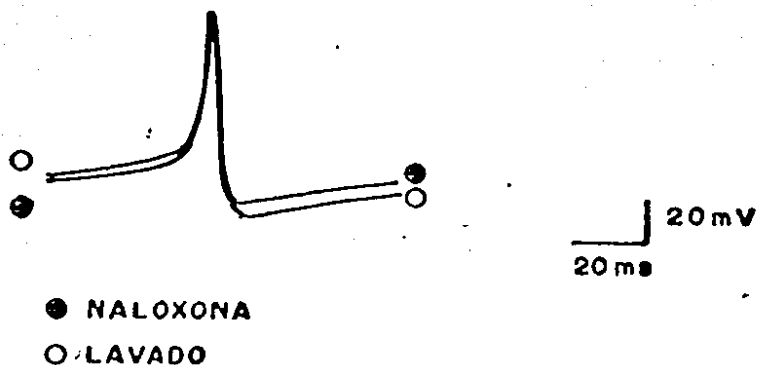
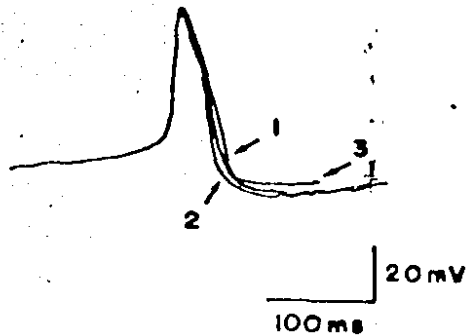


FIGURA 18. Efecto de la naloxona y el lavado sobre el potencial de acción de la célula F31 en $[Ca^{++}]_o = 10$ mM.

En la figura 19 se muestra un experimento con metionina-encefalina en la célula F31. En este caso, el péptido disminuyó la duración del potencial de acción y aumentó la amplitud de la PH. Este mismo efecto fue observado con el fentanil y fue revertido por el lavado de la preparación.

En R.- Ca^{++} -bajo, el potencial de acción en situación control, fue de menor duración que en R.- Ca^{++} -alto. La figura 20 muestra el efecto de la naloxona sobre potenciales de acción espontáneos. Como en el caso de R.- Ca^{++} -alto, se observó un incremento de la duración del potencial debido a una disminución de la pendiente de la fase de repolarización, asimismo, la PH se redujo en forma dependiente de la concentración de la naloxona. Este fue el único parámetro en el que se apreció una respuesta dependiente de la concentración de

naloxona. Con $R. Ca^{++}$ -bajo, la magnitud de los cambios en la forma del potencial de acción fueron menores que en $R.-Ca^{++}$ -alto y el lavado revirtió el efecto.



- 1 CONTROL ($E_m = -26$)
 2 MET-ENCEFALINA ($E_m = -28$)
 3 LAVADO ($E_m = -28$)

FIGURA 19. Efecto de la metionina-encefalina (300 nM) sobre el potencial de acción de la célula F31 en $[Ca^{++}]_o = 10$ mM.

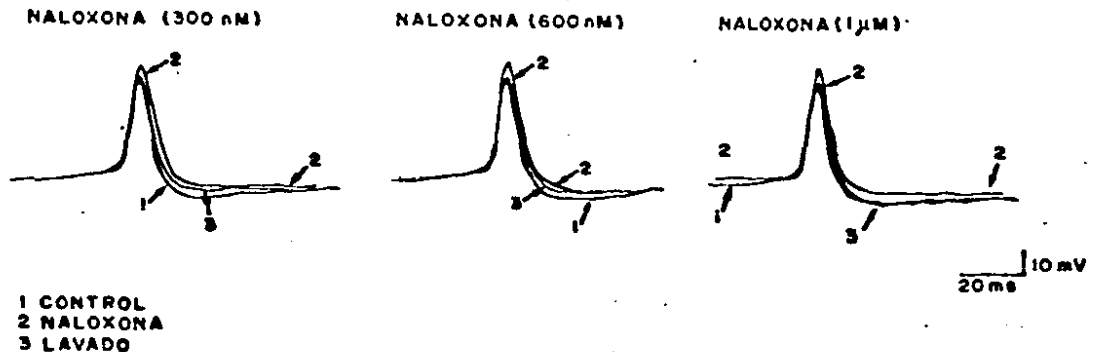


FIGURA 20. Efecto de la naloxona sobre el potencial de acción de la célula F31 en $[Ca^{++}]_o = 2$ mM. Nótese que el efecto sobre la posthiperpolarización es dependiente de la concentración del antagonista.

La figura 21 muestra potenciales de acción superpuestos en R.-Ca⁺⁺-bajo-control, con naloxona y R.-Co⁺⁺. En esta última condición, el incremento de la duración del potencial de acción, así como la supresión de la posthiperpolarización fueron más evidentes y la perfusión de R.-Co⁺⁺ con naloxona no produjo ningún efecto.

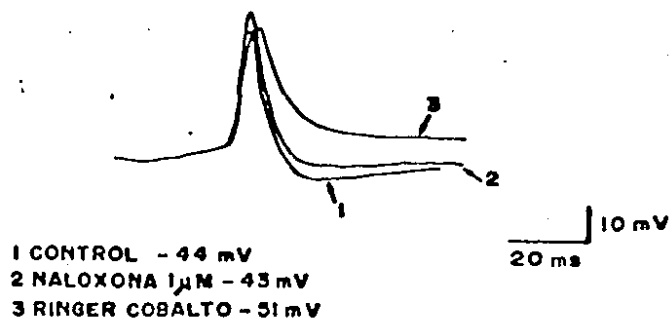


FIGURA 21. Efecto de la naloxona (1 μM) y la sustitución equimolar de Ca⁺⁺ por Co⁺⁺ sobre el potencial de acción de la neurona F31 en [Ca⁺⁺/Co⁺⁺]_o = 2 mM.

La ausencia de Na⁺ y K⁺ en el medio extracelular y la presencia de TEA y 4-AP, hacen que la corriente entrante de despolarización sea acarreada sólo por iones Ca⁺⁺ y el potencial de acción se alargue debido al bloqueo de canales de K⁺. El análisis de los potenciales de acción cálcicos mostró un incremento consistente de su amplitud y duración por efecto de la naloxona, en especial en la meseta del potencial y, en menor grado, en la pendiente de la repolarización. Debido a que la perfusión con R.-TEA control (lavado) no modificó E_m, los cambios de la forma del potencial cálcico, no pueden ser

atribuidos al V_m .

Las figuras 22 y 23 muestran el efecto de la naloxona sobre los potenciales cálcicos de las células F31 y FB2.

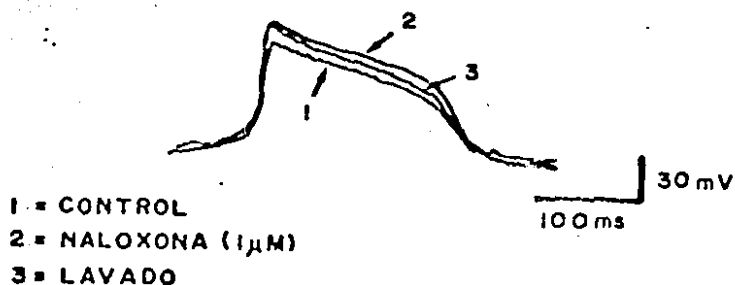


FIGURA 22. Efecto de la naloxona sobre el potencial de acción cálcico de la neurona F31. Nótese el aumento de la amplitud y duración del potencial y la reversión del efecto.

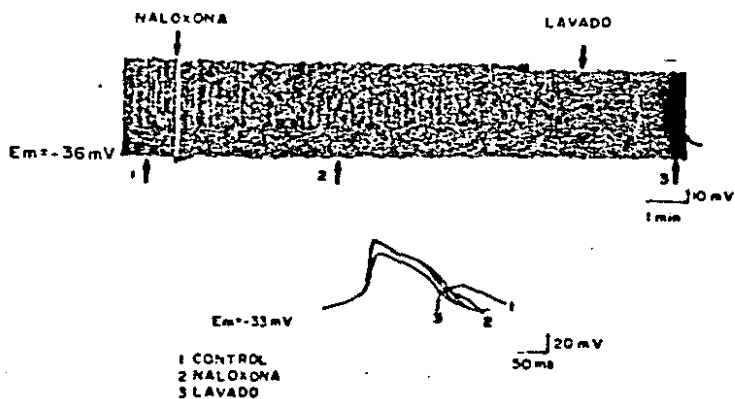


FIGURA 23. Efecto de la naloxona sobre la actividad espontánea en R-TEA y el potencial de acción cálcico de la célula FB2. Nótese cómo el lavado no produce la hiperpolarización que se observa en presencia de K^+ y el aumento de la amplitud y duración del potencial de acción durante la perfusión con naloxona.

La figura 24 muestra el efecto de la naloxona en una célula en la que no produjo ningún cambio de E_m . Esta célula (F77), no presentó potenciales cálcicos espontáneamente.

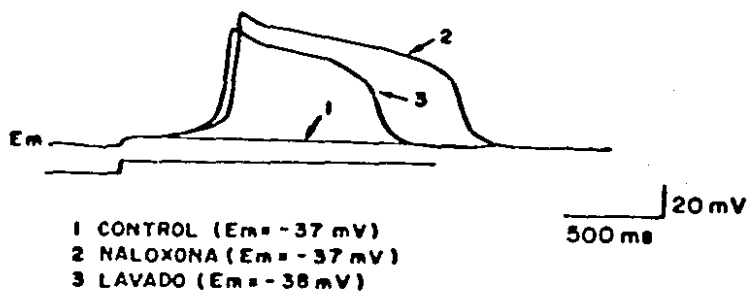


FIGURA 24. Efecto de la naloxona (300 nM) sobre el potencial de acción cálcico de la célula F77.

En todos los casos, el efecto de la naloxona sobre el potencial cálcico fue parcialmente revertido por el lavado.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Estos resultados muestran que es posible provocar cambios en la polarización de la membrana de neuronas de *Helix aspersa*, usando concentraciones bajas (250 nM) tanto de opiáceos (fentanil) como de péptidos opioides (metionina-encefalina) (300 nM). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Stefano y col. (1980) que muestran que la metionina-encefalina (1.7 µM) modifica la actividad de neuronas de *Helix pomatia*. Ambos resultados apoyan la idea de la presencia de receptores µ en estas células.

Sin embargo, Yongsiri y col. (1987) reportaron que la aplicación de una concentración muy alta (100 µM) de metionina-encefalina no produjo cambios en la actividad de neuronas identificadas del caracol gigante africano *Achatina fulica Ferussac*. Es probable que estos experimentos hayan sido llevados a cabo en neuronas no sensibles a opioides o, como se ha propuesto, en cierta época del año en que las neuronas no son sensibles a estos agonistas. (Greenberg y Price, 1983).

Por otro lado, en esta tesis se muestra que la naloxona, por sí sola, fue capaz de producir cambios sobre el potencial de membrana y el patrón de disparo.

La aplicación de naloxona a la concentración usada en esta tesis (300 nM y 1 µM), es capaz de bloquear la depresión neuronal producida por opioides y es suficiente para precipitar el síndrome de abstinencia (Cruz, 1986). En este sentido,

Johnson y North (1980) muestran que la naloxona aplicada a una concentración de $1\mu\text{M}$, y hasta de 300 nM , fue capaz de producir una despolarización (8 mV promedio) de neuronas de plexo mientérico. Este valor concuerda con los resultados aquí obtenidos, sin embargo, vale la pena destacar que en el estudio de Johnson y North las neuronas fueron incubadas en morfina durante 24 horas, lo que indica que, en ese caso, se estaba provocando un síndrome de abstinencia.

En esta tesis se muestra que la naloxona por sí sola, es capaz de incrementar la frecuencia de disparo de las neuronas de caracol y además producir cambios en el potencial de membrana. Este efecto de la naloxona no ha sido demostrado en otras preparaciones, salvo en las que han sido pretratadas con opioides, para producir un síndrome de abstinencia. En este sentido, se ha descrito que la naloxona, por ser un antagonista (opioides) no es capaz de desencadenar *per se* una respuesta fisiológica. La activación de un receptor por un agonista, sin embargo, desencadena una serie de respuestas subcelulares que terminan con la de un efector que produce una respuesta fisiológica.

Se ha reportado que los opioides inhiben la adenilato ciclasa por medio de una proteína G, misma que juega un papel muy importante en el acople receptores-canales (de calcio). La aplicación de esta proteína a la preparación revierte el efecto de la DADLE -un agonista opioide- sobre las corrientes de calcio (Hesheler y col., 1984).

DeMontis y col. (1987) mostraron que este mismo agonista y la dinorfina inhiben la actividad basal y estimulada de adenilato ciclasa en estriado de ratas y de cobayos y la naloxona antagoniza este efecto. Más aún, la naloxona aumenta un poco su actividad.

Es interesante notar que la inyección intracelular de AMPc alarga el potencial de acción y promueve la entrada de Ca^{++} a la célula (Woolum y Strumwasser, 1988) y bloquea $I_{K(XIV)}$ (Grega y Macdonald, 1987), efecto contrario al producido por los opioides.

En este trabajo de tesis, se muestra que la naloxona produce un alargamiento del potencial de acción, consistente con un aumento de la entrada de calcio y una disminución de la posthiperpolarización, lo que sugiere la inactivación de una corriente de K^+ . Los experimentos aquí presentados, sin embargo, no pueden dar una explicación de los mecanismos responsables de esos cambios.

El hecho de que una misma neurona sea hiperpolarizada por el fentanil y la metionina-encefalina y despolarizada por naloxona, puede ser indicativo de que ésta tiene receptores a opioides (μ) ya que ambos agonistas tienen una afinidad muy alta por éstos y las dosis usadas en el presente trabajo son bajas.

Es interesante destacar que León y col. (1987) encontraron neuronas inmunorreactivas a Leu-encefalina en la región superior del ganglio F, entre las cuales se encuentra la F82.

Esta neurona, como se ha descrito, responde tanto a los agonistas opioides como a la naloxona. Estos resultados muestran que estos efectos sobre Em se presentan de acuerdo a cierta disposición de las neuronas en los ganglios. Aquéllas que fueron despolarizadas por la naloxona corresponden a la región superior del ganglio F, y las que fueron hiperpolarizadas a la región inferior del ganglio E.

Por otro lado, los resultados de esta tesis ponen de manifiesto que la naloxona, para ejercer su efecto, depende de la disponibilidad de calcio extracelular, lo que está de acuerdo y extiende los resultados reportados por otros autores en vas deferens de cobayo (Ramaswamy y col., 1979) y en médula espinal de rana (Suzuki y col., 1987). Más aún, se muestra que la naloxona produce diferentes efectos de acuerdo a las distintas concentraciones extracelulares de calcio. Así, en R.-Ca⁺⁺-alto, en el que se llevó a cabo el mapeo, se observó una despolarización producida por la naloxona, ligeramente mayor que en R.-Ca⁺⁺-bajo (ver Tabla III) y una hiperpolarización al lavar la preparación.

La sustitución equimolar de Co⁺⁺ por Ca⁺⁺ evitó la acción de la naloxona, lo que es indicativo de que la presencia de Ca⁺⁺ en el medio extracelular es indispensable para su acción. Podría argumentarse, sin embargo, que el bloqueo de los canales de Ca⁺⁺ por Co⁺⁺ evita la transmisión sináptica y así sugerir un efecto presináptico de la naloxona. Aunque, como se discute más adelante, los resultados de esta tesis sugieren también un

efecto presináptico, se hace evidente un efecto postsináptico, ya que en las neuronas F31 y F82 se observó consistentemente una disminución de 35 a 40 % de la resistencia de entrada.

Varios autores han mostrado que la acción de la naloxona incrementa el flujo de calcio en la postsinapsis (Ramaswamy y col., 1979; Suzuki y col., 1987). Otro efecto que sugiere su acción postsináptica es el encontrado sobre la forma del potencial de acción, que se discute más adelante.

El efecto observado en las neuronas F77 y F78, que no presentaron cambios en Em, y en la F31 que sí presentó estos cambios, sugiere también un efecto presináptico de la naloxona. Las neuronas F77 y F78 presentaron un incremento en el número y amplitud de los potenciales postsinápticos. El lavado de la preparación produjo una disminución del número de PPSE (ver fig. 6) y la perfusión de la misma con $R.-Co^{++}$ los abolió completamente (ver fig. 12). Asimismo, en la neurona F31 se observó un aumento del número de PPSE, durante la perfusión con naloxona, que cambió su patrón de disparo (fig. 10); este efecto también fue reversible. Esto sugiere un posible aumento de la frecuencia de descarga de la neurona presináptica, lo que se refleja en un mayor número de PPSE. El aumento del tamaño de los PPSE es consistente con la idea de una mayor liberación de neurotransmisor, como consecuencia de una mayor entrada de Ca^{++} a la terminal presináptica. Sin embargo, hace falta un análisis cuantitativo de este efecto para apoyar esta idea.

Otra acción observada, dependiente de la concentración

extracelular de calcio, fue la hiperpolarización de larga duración producida por el lavado de la preparación después de que la naloxona produjo una despolarización con $R.-Ca^{++}$ -alto. Este efecto no es debido al cambio de Ringer en sí mismo ya que éste fue perfundido continuamente. Sin embargo, con base en los resultados de los diferentes experimentos presentados en esta tesis, se postula que esta hiperpolarización es dependiente de potasio que a su vez depende de la concentración de calcio ya que:

- 1) en los experimentos en que se usó $R.-Ca^{++}$ -bajo, este efecto no se presentó. Tanto el potencial de membrana como el patrón de disparo de las células fueron revertidos,
- 2) en los experimentos en los que se usó $R.-Co^{++}$, además de no observar la despolarización inicial producida por la naloxona en las otras situaciones, el lavado de la preparación tampoco produjo este efecto y
- 3) en los experimentos en los que se usó $R.-TEA$ para analizar el efecto de la naloxona sobre potenciales cálcicos, aunque la concentración de Ca^{++} era alta (20 mM), el medio de perfusión contenía TEA y 4-AP, bloqueadores de canales de K^+ y no se observó la hiperpolarización aunque sí se produjo la despolarización inicial.

Estos resultados sugieren pues, que esta hiperpolarización es debida a una corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} .

Esta hiperpolarización pudiera ser debida a un efecto de larga duración producida por la naloxona. Kaufman y col. (1975)

describieron que este antagonista opioide es muy liposoluble, lo que podría explicar una acción tan duradera. En un trabajo de nuestro grupo (Fernández-Guardiola y col., 1988) mostramos que un factor importante para producir actividad epiléptica por la administración de naloxona es el tiempo que ésta actúa sobre los receptores a los que se une. En este mismo sentido, el trabajo de Ramaswamy y col. (1979) demuestra que el efecto de la naloxona en *vas deferens* de cobayo -que no tiene receptores a opioides- depende del tiempo de exposición del tejido a la naloxona.

Además de estos efectos sobre la actividad espontánea, se observó que la naloxona modifica la respuesta neuronal a la estimulación eléctrica. En este sentido se encontró tanto una disminución del intervalo interespigas (que redundaría en un mayor número de potenciales de acción en un tiempo dado) como la supresión de la adaptación de la frecuencia de disparo. Ambos resultados son consistentes con un aumento de la excitabilidad celular. Varios autores (Meech, 1978; Connor, 1980; Lancaster y Nicoll, 1987) han mostrado que la posthiperpolarización del potencial de acción, debida a una corriente de potasio dependiente de calcio, determina el intervalo interespigas. Las figuras 7, 8 y 10 muestran ambos efectos que fueron revertidos por el lavado.

Estos resultados en conjunto señalan efectos de la naloxona sobre corrientes de Ca^{++} y K^+ y los resultados del análisis de los potenciales de acción sódicos y cálcicos son

consistentes con esta proposición.

Varios autores han demostrado en diferentes preparaciones, tanto de mamíferos como de invertebrados, que la repolarización del potencial de acción no es totalmente dependiente de K^+ ($I_{K(v)}$, Hodgkin y Huxley, 1952) y que las dos terceras partes inferiores de la repolarización dependen de $K^+_{[Ca^{++}]}$ (Meech, 1978; Lux y Hofmeier, 1982; MacDermott y Weight, 1982; Segal y Barker, 1986; Zhang y Krnjević, 1986; Lancaster y Nicoll, 1987; Kostyuk y Martynyuk, 1988).

Como se observa en las figuras 16 y 20, el potencial de acción es más largo en condiciones de Ca^{++} alto, con una pequeña joroba o meseta en la repolarización. En la figura 20 se muestra que la perfusión de la preparación con $R.-Co^{++}$ alarga aún más el potencial de acción y evita la posthiperpolarización. Estos datos sugieren una dependencia del Ca^{++} de la repolarización.

La perfusión de la preparación con la naloxona produjo un incremento de la duración del potencial de acción y la supresión de la posthiperpolarización. En la figura 20 se muestra un ejemplo en el que estos efectos son dependientes de la concentración de naloxona. Cuando se usó $R. Ca^{++}$ -alto, la posthiperpolarización fue mayor al lavar la naloxona. En todos los casos, estos efectos pudieron ser revertidos.

El análisis del efecto de la naloxona sobre los potenciales cálcicos permitió discriminar si el aumento de la duración de los potenciales de acción sódicos se debía a un

decremento en la entrada de calcio a la célula y, por tanto la no activación de $K^+_{[Ca^{++}]}$ o confirmar las evidencias que sugieren que la naloxona produce una mayor entrada de calcio y explicar ese incremento en la duración por medio de la inactivación de una corriente de potasio dependiente de calcio. o la inactivación de una corriente de $K^+_{(v)}$ (Thompson, 1980).

La naloxona produjo un incremento de la amplitud y duración de los potenciales cálcicos en todos los experimentos (tanto en las células sensibles, F31 y F82, como en las no sensibles a los agonistas opioides F77, F78) lo que demuestra que se promueve un mayor flujo de Ca^{++} al interior celular. El efecto más evidente se observa en la meseta de los potenciales, sin embargo la pendiente de la repolarización también se vió afectada, lo que sugiere también una alteración en I_K . Estos efectos fueron reversibles con el lavado de la preparación.

Ha sido demostrado que los péptidos opioides disminuyen la duración del potencial de acción cálcico por un incremento de la conductancia al potasio (Wertz y Macdonald, 1983; Bixby y Spitzer, 1983; Macdonald y Wertz, 1986). Esto se acompaña de un aumento de la posthiperpolarización y no es dependiente del voltaje. Sin embargo, en los experimentos presentados en esta tesis, además del aumento de la duración del potencial por la aplicación de naloxona se reduce la posthiperpolarización, lo que puede ser consistente con el aumento del flujo de calcio y la posible inactivación de una corriente de potasio. Esta proposición está además sustentada con los resultados que se

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

observan en el análisis de los potenciales de acción sódicos en R.-Ca⁺⁺-alto y bajo. En este sentido, Thompson (1980) ha señalado que el incremento de la duración del potencial de acción depende de la inactivación de $I_{K(V)}$ y de la presencia de una corriente entrante de Ca⁺⁺. Estos mismos resultados son encontrados por Zhang y Krnjević (1986) y por Kostyuk y Martynyuk (1988) en los que muestran que la 4-AP disminuye la posthiperpolarización producida por $I_{K(Ca^{++})}$.

Más aún, Racké y col. (1987) muestran que la naloxona incrementa la duración del potencial de acción por la inactivación de $I_{K(V)}$, lo que produce un incremento de la cantidad de oxitocina que se libera en rebanadas de hipotálamo. En esta tesis se muestra que, efectivamente hay una mayor actividad sináptica con la presencia de naloxona, un aumento de la duración del potencial de acción y un decremento o abolición de la posthiperpolarización, lo que permite proponer que la naloxona incrementa el flujo de Ca⁺⁺ al interior de la célula e inactiva una corriente de $K_{(Ca^{++})}$ o $K_{(V)}$.

Significado fisiológico de estos hallazgos

Como se ha señalado, la naloxona es capaz de incrementar los reflejos espinales, de favorecer la aparición o incrementar la duración de crisis convulsivas generalizadas y producir un aumento en la amplitud y la aparición de componentes tardíos en los potenciales evocados. Todos estos datos son consistentes con un aumento de la excitabilidad celular producida por la naloxona y que pueden estar relacionados con el antagonismo de la acción inhibitoria de los opioides endógenos. Sin embargo, no sólo el antagonismo de la acción inhibitoria de los opioides endógenos puede subyacer a estos efectos.

Los resultados de esta tesis permiten sugerir que si bien el incremento de la excitabilidad producido por la naloxona, al menos en neuronas de *Helix aspersa*, se debe al bloqueo de los receptores a opioides, lo que evita la acción inhibitoria de éstos, ésta produce cambios ~~per se~~ que pueden estar o no asociados a su acción antagonista. Es decir, cambios en el potencial de membrana, que en algunos modelos experimentales sólo se producen después de un tratamiento previo con agonistas opioides (síndrome de abstinencia) o cambios en el flujo de calcio al interior de la célula en neuronas que no son sensibles a los agonistas opioides. Sin embargo, para hacer extensiva esta conclusión al sistema nervioso central de mamíferos, hacen falta más evidencias experimentales.

BIBLIOGRAFIA

1. Aiello, E., Hager, E., Akiwumi, C., Stefano, G.B. An opioid mechanism modulates central and not peripheral dopaminergic control of ciliary activity in the marine mussel *Mytilus edulis*. Cellular and Molecular Neurobiol. 6(1):17-30, 1986.
2. Alvarez-Leefmans, F.J., Rink, T.J., Tsien, R.Y. Free calcium ions in neurons of *Helix aspersa* measured with ion-selective micro-electrodes. J. Physiol. 315:531-548, 1981.
3. Barker, J.L., Smith Jr., T.G., Neale, J.H. Multiple membrane actions of enkephalin revealed using cultured spinal neurons. Brain Res. 154:153-158, 1978.
4. Bixby, J.L., Spitzer, N.C. Enkephalin reduces calcium action potentials in Rohon-beard neurons *in vivo*. J. Neurosci. 3(5):1014-1018, 1983.
5. Bradley, P.B., Dray, A. Morphine and neurotransmitter substances: a microiontophoretic study in the rat brain stem. Br. J. Pharmacol. 50:47-55, 1974.
6. Breuker, E., Dingledine, R., Iversen, L.L. Evidence for naloxone and opiates as GABA antagonists. Proceedings of the BPS Sept. 458, 1976.
7. Catley, D.M., Clarke, R.W., Pascoe, J.E. Naloxone enhancement of spinal reflexes in the rabbit. J. Physiol. 339:61-73, 1983.
8. Chvátal, A., Hájek, I., Syková, E. The effects of opioid peptides and naloxone on the activity of membrane Na,K ATPase in spinal cord. Symposium Neurone and Glia Microenvironment. Abstr. 11 Prague, 1987.
9. Connor, J.A. The fast K^+ channel and repetitive firing. En: Koester, J. y Byrne, J.H. (Eds.) Molluscan nerve cells: from biophysics to behavior. Cold Spring Harbor Laboratory, 1980, pp. 125-134.
10. Corcoran, M.E., Wada, J.A. Naloxone and the kindling of seizures. Life Sci. 24:791-796, 1979.
11. Cruz, S. Un modelo cinético de la dependencia y del síndrome de abstinencia a opiáceos. Tesis de Maestría en Ciencias (Farmacología), CINVESTAV, I.P.N., 1986.

12. Cruzblanca, H., Regen, C., Alvarez-Leefmans, F.J. Efectos de activadores de la proteína cinasa C sobre la corriente de calcio en neuronas del *Helix aspersa*. Memorias de la IV Reunión de Investigación. Instituto Mexicano de Psiquiatría. 133-142, 1988.
13. Cupello, A., Hydén, H. On the presence of met 5-enkephalin receptors on the plasma membrane of Deiters' neurons and their modulation of GABA transport. *J. Neurosci. Res.* 6:579-583, 1981.
14. Davies, J. Effects of morphine and naloxone on Renshaw cells and spinal interneurons in morphine dependent and non-dependent rats. *Brain Res.* 113:311-326, 1976.
15. DeMontis, G.M., Devoto, P., Preti, A., Tagliamonte, A. Differential effect of mu, delta, and kappa opioid agonists on adenylate cyclase activity. 17: 435-439, 1987.
16. Dingledine, R., Iversen, L.L., Breuker, E. Naloxone as a GABA atagonist evidence from iontophoretic, receptor binding and convulsant studies. *Eur. J. Pharmacol.* 47:19-27, 1978.
17. Duggan, A.W., Davies, J., Hall, J.G. Effects of opiate agonists and antagonists on central neurons of the cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196:107-120, 1976.
18. Duggan, A.W., North, R.A. Electrophysiology of opioids. *Pharm. Rev.* 35:221-281, 1983.
19. Fernández-Guardiola, A., Calvo, J.M., Barragán, L.A., Alvarado, R., Condés-Lara, M. Kindling in the spinal cord: differential effects on mono- and polysynaptic reflexes and its modifications by atropine and naloxone. *Electroencephal. clin. Neurophysiol. Suppl* (36):257-263, 1982.
20. Fernández-Guardiola, A., Calvo, J.M., Pellicer, F. Long-term synaptic potentiation and burst response increment could be due to enkephalinergic disinhibition. Experiments on the spinal cord and amygdaloid kindling. En J.A. Wada (Ed.) *Kindling 3*, New York, Raven Press, 1986 pp. 157-172.
21. Fernández Guardiola, A., Pellicer, F., Calvo, J.M. Sensitization and habituation in cutaneous polysynaptic pathways of the cat spinal cord. Possible role of enkephalinergic processes. *International Symposium on Development and Plasticity of the Mammalian Spinal cord. Abstr. 36 Spoleto (Perugia) Italia, 1984.*

22. Fernández-Guardiola, A., Pellicer, F., Rocha, L., Gutiérrez, R. Naloxone facilitates sensory precipitation of focal and generalized seizures. Evoked potentials and power spectral analysis in the cat. *Exp. Neurol.* 101:159-175, 1988.
23. Fernández-Guardiola, A., Rocha, L., Pellicer, F., Gutiérrez, R., Calvo, J.M. Massed amygdaloid kindling: its facilitation by naloxone. *En prensa, Epilepsy Res.*, 1988.
24. Frazier, D.T., Ohta, M., Narahashi, T. Nature of the morphine receptor present in the squid axon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142:1209-1214, 1973.
25. Godfarb, J., Hu, J.W. Enhancement of reflexes by naloxone in spinal cats. *Neuropharmacology* 15:785-792, 1976.
26. Greenberg, M.J., Price, D.A. Invertebrate peptides native and naturalized. *Ann. Rev. Physiol.* 45:271-288, 1983.
27. Grega, D.S., Macdonald, R.L. Activators of adenylate cyclase and cyclic AMP prolong calcium-dependent action potentials of mouse sensory neurons in culture by reducing a voltage-dependent potassium conductance. *J. Neurosci.* 7(3):700-707, 1987.
28. Gruol, D.L., Barker, J.L., Smith, T.G. Naloxone antagonism of GABA-evoked membrane polarizations in cultured mouse spinal cord neurons. *Brain Res.* 198:323-332, 1980.
29. Hardy, Ch., Pankseep, J., Rossi III, J., Zolovick, J. Naloxone facilitates amygdaloid kindling in rats. *Brain Res.* 194:293-297, 1980.
30. Hesheler, J., Rosenthal, W., Trautwein, W., Schultz, G. The GTP-binding protein, G_o , regulates neuronal calcium channels. *Nature* 325(29):576-579, 1984.
31. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116:449-472, 1952.
32. Johnson, S.M., North, R.A. Membrane potential changes in neurones undergoing withdrawal from opiates. *Brain Res.* 190:559-563, 1980.
33. Jurna, I., Grossman, W. The effect of morphine on mammalian nerve fibres. *Eurp. J. Pharmacol.* 44:339-348, 1977.
34. Kaufman, J.J., Semo, N.M., Koshi, W.S. Microelectrometric titration measurement of the pK_a 's and partition and drug distribution coefficient of narcotics and narcotic antagonists and their pH and temperature dependence. *J. Med. Chem.* 18:647-655, 1975.

35. Kavaliers, M., Hirst, M. Slugs and snails and opiate tales: opioids and feeding behavior in invertebrates. *Federation Proc.* 46:168-172, 1987.
36. Kavaliers, M., Hirst, M. The presence of an opioid system mediating behavioral thermoregulation in the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. *Neuropharmacology* 23(11):1285-1289, 1984.
37. Kerkut, G.A., Lambert, J.D.C., Gayton, R.J., Loker, J.E., Walker, R. Mapping of nerve cells in the subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 50A:1-25, 1975.
38. Kostyuk, P.G., Martynyuk, A.E. Potassium outward current dependent on extracellular calcium in snail neuronal membrane. *Neuroscience* 4(3):1081-1087, 1988.
39. Ku, B.S., Takeuchi, H., Yanaiharu, N., Munekata, E., Ariyoshi, Y. Effects of synthetic peptides on giant neurones identified in the ganglia of an african giant snail (*Achatina fulica Ferussac*). *Comp. Biochem. Physiol.* 84C(2):391-396, 1986.
40. Lancaster, B., Nicoll, R.A. Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* 389:187-203, 1987.
41. León Días, M., Sánchez Alvarez, M., Briones Velasco, M., Martínez Servín, M. Existencia de inmunorreactividad a leu-enkefalina en neuronas de caracol de jardín *Helix aspersa*. XXX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas Jalapa, Veracruz, 1987.
42. Lux, H.D., Hofmeier, G. Properties of a calcium- and voltage-activated potassium current in *Helix pomatia* neurons. *Pflügers Arch.* 394:61-69, 1982.
43. MacDermott, A.B., Weight, F.F. Action potential repolarization may involve a transient, Ca^{++} -sensitive outward current in a vertebrate neurone. *Nature* 300(5888):185-188, 1982.
44. Macdonald, R.L., Werz, R.A. Dynorphin decreases voltage-dependent calcium conductance of mouse dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 377:237-249, 1986.
45. McCarren, M., Alger, B.E. Sodium-potassium pump inhibitors increase neuronal excitability in the rat hippocampal slice. Role of a Ca^{++} dependent conductance. *J. Neurophysiol.* 57(2):496-509, 1987.
46. Meech, R.W. Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 7:1-18, 1978.

47. Mudge, A.W., Leeman, F.E., Fishbach, G.D. Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 76:526-530, 1979.
48. North, R.A. Opioid receptor types and membrane ion channels. TINS, March, 114-117, 1986.
49. North, R.A., Williams, J.T. On the potassium conductance increased by opioids in rat locus coeruleus. J. Physiol. 364:265-280, 1985.
50. North, R.A., Williams, J.T. Opiate activation of potassium conductance inhibits calcium action potentials in rat locus coeruleus neurones. Br. J. Pharmacol. 80:225-228, 1983.
51. Pellicer, F., Rocha, L., Gutiérrez, R., Fernández-Guardiola, A. Efectos de la naloxona sobre la actividad unitaria y respuesta refleja de la médula espinal del gato, producidas por estimulación eléctrica del nervio sural y estimulación táctil. XXX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Guanajuato, Gto., Julio 1986.
52. Pellicer, F., Rocha, L., Gutiérrez, R., Fernández-Guardiola, A. Epileptogenesis and hypertonic post-ictal phenomena induced by naloxone in intact cats. Epilepsy 29:374-378, 1988.
53. Racké, K., Altes, U., Baur, A.M., Jost, D., Schafer, J. Tetraethylammonium ions and 4-aminopyridine prevent opioid inhibition of neurohypophysial oxytocin release. Brain Res. 436:371-373, 1987.
54. Ramaswamy, S., Nazimudeen, S.K., Kameswaran, L. Effect of naloxone on the sensitivity of the vas deferens to various agonists. J. Pharm. Pharmacol. 31:222-223, 1979.
55. Rocha, L., Pellicer, F., Gutiérrez, R., Fernández-Guardiola, A. Cambios de los potenciales evocados visuales inducidos por la administración de dosis únicas de naloxona y su reversión por fentanil en la preparación de encéfalo aislado de gato. XXX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas Jalapa, Veracruz, Julio 1987.
56. Sakharov, D.A., Salánki, J. Physiological and pharmacological identification of neurons in the C.N.S. of *Helix pomatia* L. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 35(1): 19-30, 1969.

57. Sawynok, J., Pinsky, C., LaBella, F.S. On the specificity of naloxone as an opiate antagonist. *Life Sci.* 25:1621-1632, 1979.
58. Segal, M., Barker, J.L. Rat hippocampal neurons in culture: Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent K^{+} conductances. *J. Neurophysiol.* 55(4):751-766, 1986.
59. Shimahara, T., Icard-Liepkalns, C. Activation of enkephalin receptors reduces calcium conductance in neuroblastoma cells. *Brain Res.* 415:357-361, 1987.
60. Snyder, E.W., Dustman, R.W., Schlehuber, C. Naloxone epileptogenesis in monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217:299-305, 1981.
61. Stefano, G.B., Catapane, E.J. Methionine enkephalin and leucine enkephalin increase dopamine in the CNS of *Mytilus edulis*. *Soc. Neurosci.* 4:892, 1978.
62. Stefano, G.B., Leung, M.K. Presence of met-enkephalin-Arg6-Phe7 in molluscan neural tissues. *Brain Res.* 298:362-365, 1984.
63. Stefano, G.B., Rózsa, K.S., Hiripi, L. Actions of methionine enkephalin and morphine on single neuronal activity in *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 66C:193-198, 1980.
64. Stefano, G.B., Vadasz, I., Hiripi, L. Naloxone selectively blocks dopamine response of Br-type neuron in *Helix Pomatia* L. *Experientia* 35:1337-1338, 1979.
65. Stefano, G.B., Vadasz, I., Hiripi, L. Methionine enkephalin inhibits the bursting activity of the Br-type neuron in *Helix pomatia* L. *Experientia* 36:666-667, 1980.
66. Suzuki, T., Oka, J.I., Fukuda, H. In vitro studies of the effects of naloxone on the root potentials in the frog spinal cord: enkephalin-like effect on the recurrent presynaptic inhibition. *Comp. Biochem. Physiol.* 87C(1):221-225, 1987.
67. Thompson, S. Inactivation of delayed K^{+} current. In: J. Koester y J.H. Byrne (Eds.) *Molluscan nerve cells: from biophysics to behavior.* Cold Spring Laboratory, 1980, pp. 115-123.
68. Tremblay, J.P., Schlapfer, W.T., Woodson, P.B.J., Barondes, S.H. Morphine and related compounds evidence that they decrease available neurotransmitter in *Aplysia californica*. *Brain Res.* 81:107-118, 1974.

69. Velasco, M., Velasco, F., Castañeda, R., Sánchez, R. Effect of fentanyl and naloxone on human somatic and auditory-evoked potential components. *Neuropharmacol.* 23:359-366, 1984.
70. Waziri, R. Morphine effects on cholinergic synaptic transmission in *Aplysia* evidence for receptor blockade. *Comp. Biochem. Physiol.* 55C:95-102, 1976.
71. Werz, M.A., Macdonald, R.L. Opioid peptides selective for μ and δ -opiate receptors reduce calcium-dependent action potential duration by increasing potassium conductance. *Neurosci. Lett.* 42:173-178, 1983.
72. Woolum, J.C., Strumwasser, F. Calcium changes in isolated peptidergic neurons during activation by cAMP analog. *Brain Res.* 444:1-9, 1988.
73. Yaksh, T.L. Spinal opiate analgesia characteristics and principles of action. *Pain* 11:293-346, 1981.
74. Yaksh, T.L., Rudy, T.A. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Science* 192:1357-1358, 1976.
75. Yongsiri, A., Kim, K.H., Takeuchi, H., Yanaiharu, N., Munekata, E., Ariyoshi, Y. Effect of synthetic peptides on giant neurons identified in the ganglia of an african giant snail (*Achatina fulica Ferussac*) - II. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C(2):353-356, 1987.
76. Zhang, L., Krnjević, K. Effects of 4-aminopyridine on the action potential and the afterhyperpolarization of cat spinal motoneurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64:1402-1406, 1986.
77. Zieglgänsberger, W., Tulloch, I.F. The effects of methionine- and leucine-enkephalin on spinal neurones of the cat. *Brain Res.* 167:33-64, 1979.