

00381
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DE LA
CALMODULINA EN LOS PROCESOS
EPILEPTICOS

279.837

T E S I S
Que para obtener el grado académico de
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)
p r e s e n t a

MIGUEL ASAI CAMACHO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GLORIA ACACIA BENITEZ KING



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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	Página
Resumen.....	4
Capítulo 1. Introducción.....	10
1.1. Epilepsia.....	10
1.2. Encefalinas y epileptogénesis.....	17
1.3. Encefalinas.....	20
1.4. Calmodulina.....	24
1.5. Calmodulina y epilepsia.....	28
Capítulo 2. Planteamiento del problema.....	31
2.1. Hipótesis.....	32
2.2. Objetivos.....	33
2.3. Metas.....	33
Capítulo 3. Material y métodos.....	34
3.1. Diseño Experimental.....	34
3.1.1. Determinación de calmodulina durante el fotoperiodo.....	34
3.1.2. Liberación <i>in vitro</i> de encefalinas a partir de sinaptosomas.....	35
3.2. Métodos.....	38
3.2.1. <i>Kindling</i> químico con pentilinetetrazol.....	38
3.2.2. Procesamiento de las estructuras cerebrales.....	39
3.2.3. Preparación de las muestras para la determinación de CaM.....	39
3.2.4. Técnica de liberación <i>in vitro</i> a partir de sinaptosomas.....	40
3.2.5. Obtención de anticuerpos contra péptidos opioides.....	41
3.2.6. Técnica para la iodación de péptidos opioides.....	43
3.2.7. Radioinmunoensayo para los péptidos opioides.....	45
3.2.8. Cuantificación de CaM por radioinmunoensayo.....	45
3.2.9. Identificación de CaM y encefalinas por HPLC.....	48
3.2.10. Análisis de resultados.....	49

Capítulo 4. Resultados.....	56
4.1. Determinación de calmodulina en el tejido cerebral.....	52
4.2. Liberación <i>in vitro</i> de opioides.....	58
4.3. Efecto de la trifluoroperazina sobre la liberación de opioides.....	64
4.4. Efecto del PMA sobre la liberación de opioides.....	68
4.5. Efecto del TFP y W7 sobre la liberación de encefalinas.....	71
Capítulo 5. Discusión	74
Capítulo 6. Bibliografía.....	83
Glosario.....	104

RESUMEN

La epilepsia es un síndrome de disfunción cerebral que se caracteriza por la descarga sostenida y asincrónica de un grupo de neuronas cerebrales. Se ha estimado que puede afectar a un 2% de la población mundial. En el campo de investigación, la epilepsia se puede estudiar a través de modelos experimentales como el *kindling* (encendimiento), tanto eléctrico como químico con pentilenetetrazol (PTZ). El *kindling* es un fenómeno en donde la estimulación repetida ya sea eléctrica o química en estructuras del sistema límbico produce un incremento gradual y progresivo de su excitabilidad, la cual se propaga a otras regiones desencadenando las crisis convulsivas generalizadas.

El uso de estos modelos es ideal para el estudio de la epileptogénesis experimental ya que se pueden estudiar *in vivo e in vitro* los cambios neuroquímicos, electrofisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan a la célula epiléptica.

La aparición de una crisis convulsiva trae consigo la entrada de calcio a la célula nerviosa. Para mantener la homeostasis, la célula utiliza a el calcio para responder a los cambios del medio externo que la rodea. Es reconocido que la presencia del calcio es determinante para la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos.

Una de la proteínas involucradas en traducir la señal del calcio es la calmodulina

(CaM). La CaM se activa cuando se une al calcio, dando lugar a una estructura estable Ca^{2+} -CaM. Esta molécula es capaz de activar a enzimas como la cinasa II. El complejo Ca^{2+} -CaM-Cinasa II, se ha involucrado con el establecimiento del fenómeno del *kindling*, con los ritmos diurnos y en los mecanismos de secreción de los neurotransmisores. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si como resultado de las crisis convulsivas repetidas producidas por el *kindling*, la CaM presenta cambios en su contenido cerebral. Tampoco se conoce si la concentración de CaM se modifica durante el fotoperiodo. Por último, si una de las funciones primordiales de la CaM es la de estar involucrada con la secreción de neurotransmisores, hasta el momento se desconoce si se puede involucrar en la liberación de los péptidos opioides. Las encefalinas, se han involucrado en la epileptogénesis, se ha propuesto que su liberación contribuye a restringir la propagación y severidad de una crisis convulsiva. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la liberación de encefalinas son desconocidas. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo, fue determinar la cantidad de CaM presente en el tejido control y epileptizado, tanto en la fase de luz, como en la de obscuridad. Si una de las funciones de la CaM se encuentra relacionada con la secreción de neurotransmisores, en el presente trabajo se estudió en condiciones control, la

posible participación de la CaM en la secreción de encefalinas. También exploramos la participación de otra enzima involucrada en los procesos de secreción, la PKC.

Los resultados mostraron que 1) En los animales control y sometidos al *kindling* con PTZ, la CaM tiene un ritmo circádico. Su concentración aumentó en algunas estructuras, como la amígdala principalmente, durante la fase de oscuridad. 2) El contenido de CaM no se modificó al comparar a los animales sometidos al *kindling* contra sus correspondientes controles. 3) La CaM fue capaz de modular selectivamente la liberación de encefalinas. La presencia de los inhibidores de la CaM como el TFP y la naftalensulfonamida (W7), fueron capaces de inhibir significativamente, la liberación de Met-encefalina, hepta y octapéptido, pero no así de Leu-encefalina. La participación de la enzima PKC en la liberación de encefalinas, parece estar relacionada con la secreción de la Leu-encefalina, ya que la presencia de un agonista de la enzima el éster de forbol (PMA), aumentó significativamente la liberación de Leu-encefalina y no modificó la de Met-encefalina.

Hasta donde conocemos, los resultados del presente trabajo son los primeros en demostrar que el contenido de CaM se modifica durante el fotoperiodo. La

concentración máxima de CaM se obtuvo durante la fase de obscuridad. Sin embargo, sin importar el estado alterado en la excitabilidad neuronal que presentan las ratas epileptizadas con PTZ, la concentración de CaM no sufrió cambios, al compararlos con los animales control. Estos datos sugieren que el aumento nocturno en el contenido de CaM en el tejido nervioso puede estar relacionado con el de las encefalinas. Es posible que la interacción de la CaM con los factores de transcripción que expresan al gen de la proencefalina A, sea un mecanismo endógeno para controlar la síntesis nocturna de los opioides. También observamos que la CaM puede actuar selectivamente sobre la liberación de los opioides derivados de la proencefalina A, como la Met-Encefalina, Heptapéptido y Octapéptido. La liberación de Leu-encefalina, solamente sufrió modificaciones en presencia del éster de forbol (PMA), agonista de la enzima PKC. Estos datos nos sugieren que esta enzima junto con la CaM puede estar involucrada en la secreción de opioides. Por lo tanto, el efecto fisiológico de la CaM y de la PKC y de la naturaleza del péptido a liberar, dependerá de la estructura analizada, de su localización subcelular, distribución y concentración neuronal.

Summary

Calmodulin (CaM) through activation of CaM-kinase II may be involved in the molecular mechanism underlying the epileptogenic processes. Some evidence suggests that kindling responses change across the day-night cycle. In order to test if kindling stimulation modifies CaM content, we measured CaM concentrations in amygdala, hippocampus and hypothalamus obtained from control and kindled rats during light and darkness. Male Wistar rats (250- 300 g), were injected i.p. with pentylenetrazol (PTZ) (35 mg/kg/24 h). Once chemical kindling was established, rats were sacrificed by decapitation at 10:30 a.m. and 01:30 a.m. The brains were obtained, and the amygdala, hippocampus and hypothalamus dissected. CaM content was measured in the cytosol and membrane fractions by radioimmunoassay. We found a significant increase in CaM content in cytosol and membrane fractions of both control and kindled rats during the dark phase. No significant differences in CaM concentrations were observed between control and experimental rats, whether during the light or the dark phase. The data suggest a well defined photoperiodic variation in CaM concentration in limbic structures, despite the neuronal excitability produced by kindling. Among several physiological functions , CaM has been involved with the secretory processes in rat brain.

However, at the present time, there is not evidence that CaM could be related with the opioid peptide release from nerve terminal endings of the rat brain. In the present investigation we assessed in control rats, the enkephalin release in the presence of two CaM antagonists TFP and W7. Also, we tested the possible Protein Kinase C (PKC), participation in the enkephalin release. These experiments were performed in the presence of a PKC agonist, the phorbol ester the PMA. Our results showed that Met-enkephalin release from amygdala synaptosomal preparation could be regulated by CaM. CaM antagonist TFP and W7 were able to inhibit the Met-enkephalin release. No changes were observed in Leu-enkephalin release. However, Leu-enkephalin release was selectively increased by PMA. Taken together, these data suggest that enkephalin release could be selectively regulated by CaM and PKC.

1.0 INTRODUCCIÓN.

1.1. Epilepsia.

La epilepsia es un síntoma de disfunción cerebral de carácter recurrente que se caracteriza por la descarga sostenida y asincrónica de un grupo de neuronas cerebrales. Las etiologías son variadas, por lo que la epilepsia *per se* no se considera una enfermedad específica. Las crisis epilépticas se pueden manifestar como complicación de accidentes infecciosos, traumáticos, tumorales, por alteraciones sistémicas y por desórdenes metabólicos. Se estima que de 300 a 600 personas de cada 10,000 presentan actividad epiléptica (12). Para su estudio las crisis epilépticas se han dividido en los siguientes grupos de acuerdo a los criterios establecidos por la Liga Internacional Contra la Epilepsia: (103)

I. Crisis parciales (focales, locales): Las crisis parciales son aquellas en las que el primer evento clínico y electroencefalográfico señala una activación de un grupo neuronal en uno o en ambos hemisferios. Las crisis parciales a su vez se clasifican en:

- a. Crisis parciales simples (sin alteración en la conciencia)

- b. Crisis parciales complejas

- 1. Con alteraciones de la conciencia al inicio.

- 2. Parcial simple al inicio, seguida de deterioro de la conciencia

c. Crisis parciales que evolucionan a convulsiones tónico-clónicas generalizadas

1. Simples que evolucionan a crisis tónico-clónicas generalizadas.

2. Complejas que evolucionan a crisis tónico-clónica generalizadas.

II. Crisis generalizadas (convulsivas y no convulsivas): las crisis generalizadas son aquellas en las que la primera manifestación incluye ambos hemisferios cerebrales.

La conciencia puede alterarse y ser la manifestación inicial. Las manifestaciones motoras son bilaterales. La descarga neuronal se propaga a ambos hemisferios. A su vez se clasifican en:

a.

1. crisis de ausencia

2. ausencia atípicas

b. Ausencia que progresa a convulsión tónico-clónica generalizada

c. Crisis tónicas

d. Crisis tónico-clónicas

e. Crisis atónicas

III. Crisis epilépticas no clasificadas: incluye todas las crisis que no pueden clasificarse debido a datos incompletos o inadecuados y en algunas de las cuales no pueden incluirse en las categorías hasta ahora descritas, como por ejemplo:

movimientos oculares rítmicos y movimientos de natación y masticatorios.

IV. Adendum

1. Crisis epilépticas repetidas: ataques fortuitos y sin provocación aparente.

Ataques cíclicos a intervalos regulares.

2. Crisis prolongadas o repetitivas (*status epilepticus*): el término se emplea cuando una crisis persiste por un periodo prolongado.

La epilepsia puede ser estudiada con diversos modelos experimentales que se dividen para su estudio en dos grandes grupos: 1) modelos de actividad epileptógena localizada (con posibilidades de generalización secundaria) y 2) los modelos de actividad epileptógena generalizada. (12,48). El modelo de *kindling* (encendimiento) eléctrico pertenece al primer grupo y es considerado hasta la fecha, como el arquetipo de los modelos experimentales de epilepsia y de plasticidad neuronal.

El *kindling* eléctrico como modelo para estudiar las epilepsias humanas cobra relevancia al observar las similitudes neurofisiológicas entre las características de la epilepsia humana y el modelo del *kindling* en animales. La expresión conductual de las convulsiones producidas por el *kindling* muestran semejanzas con las producida por los seres humanos como las convulsiones parciales complejas y con

las convulsiones generalizadas secundarias del tipo tónico-clónicas . El patrón electroencefalográfico en los humanos, en estructuras como la amígdala e hipocampo son similares a las registradas en el cerebro del animal epileptizado. Las espigas interictales están presentes en el EEG tanto de los animales (7) como en la de los pacientes epilépticos (71). Con el modelo del kindling es posible estudiar los fenómenos eléctricos, los cambios iónicos a través de la membrana neuronal y de la glía, las alteraciones neuroquímicas en la neurotransmisión y los procesos moleculares de tipo transitorio y permanente que subyacen a la epileptogénesis y a otros estados alterados de la excitabilidad neuronal (37,38,39). El *kindling* eléctrico se produce por medio de la estimulación eléctrica repetida de baja intensidad en algunas estructuras cerebrales, entre las que destacan aquellas que conforman al sistema límbico. Este proceso da como resultado un incremento gradual y progresivo de la actividad neuronal, la cual termina con crisis generalizadas tónico-clónicas. La hipersensibilidad neuronal a la estimulación eléctrica puede durar largos periodos, e inclusive, toda la vida del animal (48). Dentro del segundo grupo de los modelos experimentales de crisis convulsivas se consideran los producidos mediante la administración de diferentes agentes químicos, como el carbacol, lidocaína, cocaína, xilocaína y pentilenetetrazol (PTZ)

(44). El modelo de *kindling* químico más estudiado y mejor caracterizado es el producido con el PTZ (34,70), el cual conserva los patrones conductuales y similares a los descritos para el modelo eléctrico y se compone de las siguientes fases: Fase 1) sin movimiento, Fase 2) movimiento de la cabeza "mioclonias", Fase 3) torcedura del tronco y cabeza de la rata, Fase 4) posición de canguro, el animal se para en sus patas posteriores, Fase 5) Crisis tónico-clónicas generalizadas con posición de canguro y caída hacia atrás.

La actividad epiléptica del sistema límbico que se produce durante las crisis tónico-clónico generalizadas, a grandes rasgos incluye las siguientes fases; 1) fase ictal; periodo de mayor actividad neuronal en donde se manifiestan las crisis tónicas y clónicas, 2) periodo refractario: ocurre después del potencial de acción y en donde es imposible excitar a la célula no importa que tan grande sea el estímulo 3) depresión postictal; se caracteriza por inmovilidad del sujeto y ausencia de respuestas a estímulos del medio ambiente 4) periodo interictal; que abarca la actividad neuronal entre el término de la depresión postictal y el inicio de una nueva fase ictal (26,28). Se ha postulado que la depresión postictal y la actividad interictal constituyen un proceso de protección neuronal que impide la producción de actividad epiléptica inmediatamente después de una crisis epiléptica

(29). La herramienta electrofisiológica permitió en su momento establecer las fases del kindling, esta separación daba la oportunidad de realizar las mediciones bioquímicas, neuroquímicas y farmacológicas para estudiar a nivel molecular el fenómeno del *kindling*.

Durante varias décadas, diferentes líneas de investigación estuvieron concentradas en analizar la participación de los neurotransmisores clásicos en las alteraciones biofísicas y neuroquímicas relacionadas con la epileptogénesis. La caracterización del material liberado, así como la de sus receptores, pre y postsinápticos, permitieron establecer las bases neuroquímicas de la epilepsia. Sin embargo, en la década de los ochentas (62) se identificaron nuevas características y propiedades de la neurotransmisión, al descubrir que en una célula nerviosa pueden coexistir los neuropéptidos y los neurotransmisores clásicos. Desde la perspectiva bioquímica, el estudio de los mecanismos moleculares que modulan la actividad neuronal, recibió un fuerte impulso cuando se demostró que los neuropéptidos también actúan como neurotransmisores (62,63,64). Una de las primeras diferencias y propiedades que se descubrieron fue que la frecuencia de estimulación requerida para producir la liberación de neuropéptidos era más alta en comparación con la requerida para la liberación de los neurotransmisores

clásicos (63). El interés por estudiar a los neuropéptidos tiene su origen en los trabajos de Guillemin (52) y Schally y col. (113), quienes identificaron, por vez primera, la naturaleza peptidérgica del factor liberador de la hormona luteinizante, de la tirotropina y de la somatostatina. En los años siguientes, se pudo establecer la secuencia de aminoácidos que conformaban a la Substancia P cuya fisiología se ha relacionado con el dolor (21). A la mitad de la década de los setentas fueron aislados, purificados y secuenciados, dos péptidos opioides endógenos, conocidos como Met y Leu-encefalina. Se demostró en los ensayos *in vitro* que estos péptidos eran capaces de unirse al receptor de la morfina. En particular, los péptidos opioides dieron la oportunidad de explorar, por vez primera, los mecanismos moleculares del dolor y de los narcóticos usando como herramienta bioquímica a las encefalinas. A partir del descubrimiento de los péptidos opioides quedó establecido que los péptidos cerebrales representaban una nueva clase de neurotransmisores químicos que podían intervenir directamente en la transmisión sináptica (63,64). Poco tiempo después del descubrimiento de las encefalinas, se demostró que su aplicación por vía intracerebroventricular producía cambios electroencefalográficos similares a las producidos durante la actividad interictal en las epilepsias humanas y por el kindling eléctrico (18,36). Hallazgo que sugería

la posible participación de las encefalinas en la epileptogénesis .

1.2. Encefalinas y Epileptogénesis.

Las técnicas inmunohistoquímicas demostraron que en los cuerpos celulares y en las fibras de la amígdala del lóbulo temporal se localizan tanto las encefalinas como sus receptores (59, 115). Uhl y col., descubrieron la existencia de una vía encefalinérgica que conecta a los núcleos centrales amigdalinos con la *stria terminalis* (127), la cual al ser lesionada facilitaba el *kindling* eléctrico (36). Paralelamente, el grupo de Hong y col. reportó que al aplicar el electroshock convulsivo en forma repetida al cerebro de la rata, se producía un incremento significativo en el contenido tisular de Met-encefalina (65). Estos resultados sugerían que las encefalinas podían estar relacionadas con la epileptogénesis. Esta hipótesis fue demostrada por nuestro grupo, al describir que el contenido tisular de Met y Leu-encefalina se modificaba en forma selectiva en el cerebro de la rata, durante y después del *kindling* eléctrico amigdalino (121,131,132). Como se ha mencionado previamente, la depresión postictal se caracteriza por la reducción de la susceptibilidad a la aparición de crisis epilépticas subsecuentes (18, 37, 94). La administración de naloxona, un antagonista de los péptidos opioides, reduce la duración de la depresión postictal inducida por el *kindling* en la amígdala cerebral

y en el hipocampo (18,28,29, 42,43,45,75,119) propiciando la rápida reaparición de una nueva crisis convulsiva tónico-clónica (Fase 5). El concepto de que las encefalinas ejercen un efecto protector contra la aparición de crisis convulsivas subsecuentes, surgió a partir de experimentos en los que se observó que la liberación de los opioides durante el electroshock convulsivo inhibía el desarrollo del *kindling* amigdalino (38,39,50,107,114), efecto que era revertido por la naloxona (56,114). Además, datos clínicos demostraron que los pacientes con epilepsia presentaban concentraciones elevadas de Leu-encefalina en el líquido cefaloraquídeo (71). Es importante señalar que la actividad epiléptica repetida produce un incremento en la concentración del ARNm que codifica para la proencefalina A y de las encefalinas como productos finales biológicamente activos. El contenido de ARNm que codifica para la proencefalina A y para la Prodinorfina aumenta significativamente después de la aplicación de ácido kaínico (74), del electroshock convulsivo (140) y del *kindling* eléctrico amigdalino (95). Durante el desarrollo del *kindling* amigdalino, los niveles tisulares de los precursores y de las encefalinas aumentan significativamente en varias estructuras del sistema nervioso, principalmente en el sistema límbico (69,80,86,92,95,121,132). El aumento en el contenido tisular de opioides se

encuentra asociado con un incremento en su liberación presináptica. El electroshock convulsivo, provocó la liberación del octapéptido en el líquido cefaloraquídeo (68) y el *kindling* químico con PTZ la liberación del heptapéptido, octapéptido y de ambas encefalinas (7).

Los cambios producidos por el *kindling* son de larga duración, ya que los niveles de opioides permanecen aumentados al menos 15 días después de la última crisis convulsiva (3) y durante las 24 horas del día en las estructuras del sistema límbico (3,4). La participación de los opioides en la epilepsia, se encuentra estrechamente relacionada con la transmisión gabaérgica (17,27). Agentes químicos como el PTZ y la penicilina entre otros, compiten por el sitio de unión del ácido gama aminobutírico (GABA) en el receptor GABA tipo A (27). La falla en la transmisión inhibitoria gabaérgica provoca que la transmisión excitatoria se propague rápidamente a todo el SNC. Varias líneas de investigación han sugerido que una vez que la transmisión gabaérgica se encuentra disminuida, el organismo tiene un mecanismo de protección y compensación temporal que involucra la liberación, recambio y síntesis de opioides que pueden impedir la aparición de una nueva crisis convulsiva (53). Con base en estos estudios, se postula que la liberación de péptidos opioides provocada por la actividad epiléptica repetida,

contribuye a restringir la propagación, severidad y frecuencia de las crisis convulsivas subsecuentes (18).

1.3. Encefalinas.

Las encefalinas (*en el cerebro*) fueron descubiertas en 1975 por John Hughes y col. (67). Estas biomoléculas presentan la siguiente secuencia: $\text{NH}_2\text{-Tyr}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Phe}^4\text{-Met}^5\text{-COOH}$ (Met-encefalina) y $\text{NH}_2\text{-Tyr}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Phe}^4\text{-Leu}^5\text{-COOH}$ (Leu-encefalina). La localización subcelular, la caracterización de sus receptores estereoespecíficos y su extensa distribución anatómica, tanto en el sistema nervioso central (SNC), como periférico (SNP), permitieron sugerir que estos dos péptidos podían participar en la fisiología celular (ver revisiones 6,90). Estudios posteriores, demostraron que las encefalinas en realidad forman parte de un extenso grupo de péptidos, todos ellos con potente actividad opioide, a los cuales en forma genérica se les denominó *endorfinas*.

La presencia en el tejido neural de dos péptidos de 5 aminoácidos cada uno, sugería que podían derivarse del procesamiento de un precursor de alto peso molecular (al igual que muchas hormonas proteicas), el cual a través del procesamiento postraduccional podía dar lugar a las encefalinas como productos finales biológicamente activos. A partir de la década de los ochentas y con el uso

de las técnicas de la biología molecular se han identificado 3 precursores de alto peso molecular que dan lugar a los péptidos opioides: 1) la proencefalina A (PA), de la cual se obtienen las encefalinas, 2) la prodinorfina (PD), que da origen a las dinorfinas y en cuya secuencia se encuentra a la Leu-Encefalina y ninguna copia de Met-Encefalina, 3) la proopiomelanocortina (POMC), de la cual se originan entre otras moléculas la ACTH y la β -endorfina (51, 98,126).

Una vez establecida la secuencia de aminoácidos de la proencefalina A, se demostró que cada molécula contenía cuatro copias de Met-encefalina y una copia de Leu-encefalina, una del heptapéptido (Met-encefalina-Arg⁶-Phe⁷), y una del octapéptido (Met-encefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸). El mecanismo celular para liberar a las encefalinas de sus precursores es similar al que presentan las hormonas proteicas. La presencia de pares de aminoácidos básicos como la Arg y la Lys, son las señales bioquímicas que funcionan como sitios de reconocimiento para enzimas del tipo de la tripsina que rompe pares de aminoácidos básicos y de la carboxipeptidasa B, que elimina el aminoácido básico carboxilo terminal. Inicialmente, con el uso de estas dos enzimas, se pudo establecer la presencia de los péptidos derivados de la proencefalina A y las encefalinas como productos finales biológicamente activos. A partir de la década de los noventas, se demostró

que el procesamiento de varias hormonas proteicas y neuropéptidos, entre ellos la proencefalina A, se encuentra controlado por enzimas del tipo de las convertasas y que pertenecen a la familia de la subtilisina (111,116). Dos enzimas de este grupo son, la prohormona convertasa 1 y 2 (PC1 y PC2), que son las responsables del procesamiento postraduccionnal de la proencefalina A. Estas enzimas actúan secuencialmente en la biosíntesis de los neuropéptidos. La PC1 se activa en el retículo endoplásmico mientras que, la activación de la PC2 ocurre en la porción trans del aparato de Golgi (Trans Net Golgi) y es la responsable de la proteólisis de los precursores al ser transportados en los gránulos secretores hacia la terminal sináptica (72,142).

El proceso postraduccionnal que sufren los péptidos opioides presenta varias características bioquímicas similares a las encontradas para las hormonas proteicas.

El precursor abandona la región trans-Golgi en vesículas, que viajan a través del axón hasta la terminal sináptica. A diferencia de los neurotransmisores clásicos, los neuropéptidos se almacenan en vesículas sinápticas más grandes y densas las cuales poseen propiedades específicas tanto bioquímicas como electrofisiológicas (62,63). Los neurotransmisores de bajo peso molecular como la acetilcolina y la

noradrenalina se liberan con frecuencias de estimulación bajas, mientras que los péptidos lo hacen sólo a frecuencias de estimulación altas (63). Los estudios iniciales demostraron que la liberación *in vitro* de encefalinas es semejante a la de los neurotransmisores clásicos. Es decir, que la secreción de opioides es calcio dependiente ante una despolarización producida por el potasio, verapamil y veratridina (102,144). Por otro lado, se ha sugerido que la liberación de los neuropéptidos se inicia con un aumento uniforme en las concentraciones del calcio en el citoplasma, a diferencia de la secreción de transmisores de bajo peso molecular, como los aminoácidos o las indolaminas que requiere de una concentración elevada de calcio local (en la vecindad de los canales de calcio dependientes de voltaje) para poder liberarse, ya que sus vesículas se encuentran próximas a las zona activa de la terminal sináptica (63,124). Por su parte, las vesículas densas que contienen a los neuropéptidos pueden fusionarse en la membrana presináptica en lugares alejados de la zona activa. Es importante señalar que el efecto que poseen los neuropéptidos antes de ser degradados, les confiere una fisiología semejante a la de las hormonas proteicas y, como éstas últimas sus efectos son de larga duración, en comparación a los neurotransmisores clásicos (63).

Junto con las encefalinas, se liberan dos péptidos derivados de la Proencefalina A y que presentan actividad opioide; como el heptapéptido (Met-encefalina-Arg⁶-Phe⁷) (117) y el octapéptido (Met-encefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸) (73). La coexistencia en la terminal sináptica de los neuropéptidos con los neurotransmisores de bajo peso molecular confiere a la célula nerviosa, una mayor diversidad biofísica y bioquímica necesaria para mantener y modular la transmisión sináptica (63,64). Los datos obtenidos hasta el momento demuestran que la acción fisiológica de las encefalinas dependerá tanto de la cantidad de opioides que se libere como de la presencia y afinidad de sus receptores postsinápticos. Hasta el momento los mecanismos moleculares que subyacen a la liberación de las encefalinas aún en condiciones control son desconocidas. Sin embargo, una de las moléculas involucradas en la secreción de hormonas y neurotransmisores es la calmodulina (CaM) (47,108), por lo tanto la liberación de encefalinas podría estar mediada por la CaM.

1.4. Calmodulina

Desde los primeros trabajos realizados por Ringer en 1883 (109), quien reportó que las contracciones del corazón eran dependientes del contenido de calcio intracelular y de los trabajos de Heilbrun y Wiercinsky en 1947 (58), quienes

demonstraron por primera vez que la contracción de las fibras musculares se producía en presencia de pequeñas cantidades de calcio, la función del calcio en la fisiología celular es universalmente reconocido.

Las vías metabólicas que dan lugar a eventos tan diversos como la liberación de hormonas o la contracción muscular, tienen en común la entrada de calcio a la célula. El calcio es uno de los segundos mensajeros a través de los cuales la célula puede traducir las señales, tanto eléctricas como químicas, que convergen en la membrana celular. La señal del calcio activa cascadas bioquímicas específicas, cuya finalidad es la de responder a los cambios en el medio ambiente para mantener la homeostasis celular (14,19,20). Sin embargo, las concentraciones de calcio también requieren de ser moduladas. Hasta la fecha se han descubierto varias proteínas capaces de unirse a este catión para modular la transmisión y recepción de los mensajes intracelulares. De estas proteínas posiblemente la más estudiada y mejor caracterizada es la calmodulina (CaM), cuya función es la de actuar como un mediador de la señal del calcio en las células eucarióticas (47, 89, 118,136). Actualmente, se reconoce a la CaM, como el principal aceptor de calcio en las células no musculares. Esta proteína es ubicua, contiene 4 sitios de unión al calcio ($K_d = 2.4 \mu M$), se compone de un total de 148 aminoácidos con un peso

molecular aproximado de 16,000 Daltones (24). El calcio al unirse a la CaM modifica en forma alostérica la estructura de la proteína. Este cambio expone una región hidrofóbica de aproximadamente 20 aminoácidos, a la que se ha postulado que se unen las enzimas moduladas por la CaM (78,122). El creciente número de proteínas descubiertas que son capaces de unirse a la CaM, así como de las enzimas que para ser activas dependen de estar unidas a la CaM, han ampliado la visión que se tenía sobre la fisiología de esta proteína. La CaM se relaciona con la regulación del metabolismo de los nucleótidos cíclicos (85), interviene en el arreglo y estructura del citoesqueleto (9,87) y en diferentes estadios de la proliferación celular (88). Una de las funciones primordiales de la CaM en asociación con las enzimas cinasas (enzimas que transfieren grupos fosfatos altamente energéticos) es la fosforilación y desfosforilación de proteínas (47,115,138). La fosforilación de proteínas constituye una herramienta bioquímica fundamental para la activación e inactivación de múltiples enzimas comprometidas con el mantenimiento de la homeostasis celular. En el SNC existen dos principales clases de enzimas del tipo de las cinasas; las que son calcio dependientes y las dependientes de los nucleótidos cíclicos (97). Las cinasas dependientes de calcio a su vez se subdividen en las dependientes e independientes de calmodulina. Hasta

el momento se han identificado cuatro tipos de cinasas dependientes de CaM, denominadas CaM-Cinasa I, CaM-Cinasa II, CaM-Cinasa III y CaM-Cinasa IV (141). De particular interés para el presente trabajo de tesis, es la función de la Ca^{2+} -CaM-Cinase II (CaMKII por sus siglas en inglés), debido a que esta enzima está involucrada con la liberación de neurotransmisores (83). La CaMKII se encuentra en grandes concentraciones en el cerebro, principalmente en el hipocampo, cuerpo estriado e hipotálamo (96). En la neurona la enzima se localiza en el cuerpo celular, las dendritas y en la terminal axónica (55). El complejo Ca^{2+} -CaMKII, es capaz de modular la fosforilación de proteínas sinápticas que participan en la liberación de los neurotransmisores (25,35), tanto en sinaptosomas (30,31), como en los cultivos de células (22). Este complejo también se ha involucrado en el proceso de fusión de las membranas de la vesícula sináptica con la zona activa de la terminal axónica y con los mecanismos que permiten movilizar y dirigir a las vesículas sinápticas hacia la zona activa (57,63).

Algunas de las fosfoproteínas que participan en la modulación de la síntesis y liberación de los neurotransmisores y que se relacionan con el complejo CaMKII son: la sinapsina I, las hidroxilasas de la tirosina y del triptofano, las proteínas asociadas a los microtúbulos, las MAPs, la proteína Tau, y la fosfodiesterasa de

nucleótidos cíclicos (35, 76).

El mecanismo de inactivación del complejo Ca^{2+} -CaM, se produce en la región hidrofóbica de la CaM. A este fragmento se unen diversos fármacos que por competencia inhiben su actividad, tal es el caso de las fenotiazinas (137), y de las sulfonamidas (serie W) (61). Sin embargo, no solamente las drogas como las mencionadas son capaces de inhibir la acción de la CaM. Moléculas endógenas como la hormona Melatonina (MEL), son capaces de inhibir la actividad de la CaM alterando en las células MDCK el arreglo del citoesqueleto (8,9).

Por otro lado, es reconocido que la señal del calcio puede no solamente expresarse por su unión a la CaM. La enzima proteína cinasa C (PKC) dependiente de calcio, se encuentra ampliamente localizada en el SNC y en particular en la membrana de las terminales nerviosas (112). Recientemente, se ha demostrado que la PKC, se encuentra en la membrana presináptica y es capaz de modular la liberación de los neuropéptidos como la colecistoquinina y la bombesina (13,129).

1.5. Calmodulina-Epilepsia.

Si el efecto *kindling* produce alteraciones permanentes en la excitabilidad neuronal, y la concentración de Ca^{2+} que llega al interior de la célula nerviosa se encuentra aumentada en este proceso, las proteínas responsables de traducir el

mensaje del calcio podrían estar involucradas en la epileptogénesis (92,93,139). Wu y col. (139), demostraron que la fosforilación de dos de las subunidades de la multiproteína cinasa II dependiente de CaM (CaM-cinasaII), se reducía significativamente en la membrana sináptica del hipocampo de los animales sometidos al *kindling* eléctrico amigdalino. Datos posteriores demostraron que estos cambios estaban relacionados con las modificaciones de larga-duración en la actividad y localización de la CaM-Cinasa II en el hipocampo (134,135). La actividad de fosforilación también se reduce durante el *status epilepticus* producido por la administración de bicuculina (16.). Varias evidencias apoyan la hipótesis de que la CaM esta relacionada con la epileptogénesis a través de la interacción y activación de la CaM-cinasa II (15,134,135,139). Datos experimentales demostraron que el antagonismo de la CaM retrasa la aparición del *kindling* eléctrico (60). La CaM-cinasa II, se encuentra en grandes concentraciones en las membranas pre y postsinápticas (41,103). Los antagonistas de CaM como el W7 y la trifluoroperazina (TFP), inhiben la actividad de la CaM-cinasa II. La inhibición de este complejo enzimático también se produce en las membranas plasmáticas y en las vesículas sinápticas después de la administración de fármacos anticonvulsivantes como las fentoínas y benzodiazepinas, (31,32,33).

Sin embargo, existen datos contradictorios en cuanto a la actividad del complejo Ca^{2+} -CaM durante el *kindling*. Mientras que el grupo del doctor Wasterlain encuentra que la actividad del complejo enzimático disminuye después del *kindling* septal, el grupo del doctor Zhou, reportaron que el *kindling* eléctrico amigdalino aumenta la actividad de la CaM-Cinasa II en el hipocampo de la rata (141). Sin embargo, es necesario destacar que los datos mencionados se relacionan con la actividad y localización de la enzima CaM-Cinasa II, pero hasta el momento se desconoce si la concentración de la CaM se modifica en el *kindling*.

2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta el momento se ha demostrado la participación de la CaM en los procesos epilépticos. Sin embargo, los datos se encuentran relacionados con la concentración, actividad y localización de la enzima Cinasa II dependiente de CaM y no a la concentración de la CaM *per se*. Por otro lado, se ha descrito que la susceptibilidad a la aparición de crisis convulsivas tanto en seres humanos como en animales sometidos al *kindling* eléctrico y químico se modifica durante el fotoperiodo. En particular durante la fase de oscuridad, el número de crisis convulsivas aumenta significativamente con respecto a la fase de luz. Sin embargo, se desconoce si el contenido tisular de la CaM se modifica durante el *kindling* y/o durante el fotoperiodo.

Por otro lado, una de las funciones primordiales de la CaM se encuentra relacionada con los procesos de liberación de neurotransmisores, pero se desconoce si la CaM se encuentra involucrada en la liberación de neuropéptidos.

Si bien la enzima Proteína Cinasa C (PKC), también es una enzima cuya actividad se relaciona en los procesos de secreción de neuropéptidos como la bombesina y la colecistoquinina, hasta el momento se desconoce si esta enzima se encuentra relacionada con la liberación de las encefalinas a partir de sus terminales

nerviosas. En condiciones control, la liberación *in vitro* de encefalinas es calcio dependiente y responde a un estímulo despolarizante en presencia de una concentración alta de potasio. Hasta el momento los mecanismos moleculares que subyacen a la liberación de encefalinas son desconocidas.

2.1. HIPÓTESIS.

Hipótesis I. Si con el *kindling* eléctrico la hipersensibilidad de las neuronas aumenta durante la fase de obscuridad y las enzimas dependientes de CaM como la Cinasa II, presentan cambios selectivos en cuanto a su concentración y actividad en varias estructuras del Sistema Nervioso Central, es factible que la concentración de CaM se modifique tanto con el *kindling* químico por PTZ como durante el fotoperiodo.

Hipótesis II. Si una de las funciones de la CaM se encuentra relacionada con la secreción de hormonas y neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central y la liberación de opioides es selectiva y dependiente de calcio, es factible que la CaM pueda estar involucrada en la regulación de la liberación de encefalinas a partir de sus terminales presinápticas.

2.2. OBJETIVOS

1. Determinar la concentración de CaM presente en el tejido neural de las ratas control y sometidas al *kindling* químico con PTZ.
2. Determinar si el fotoperiodo modifica la concentración de CaM tanto en el cerebro de la rata control como en las sometidas al *kindling* químico con PTZ.
3. Establecer si en la amígdala basolateral de las ratas en condiciones control, la CaM se encuentra involucrada con la liberación de Met- y Leu-encefalina a partir de sus terminales nerviosas aisladas.
4. Se analizará la posible participación de la enzima PKC en la liberación presináptica de encefalinas.

2.3. METAS

1. Desarrollar el *kindling* químico con PTZ
2. Una vez establecido el *kindling*, se procederá a determinar el contenido de CaM presente en la amígdala, hipotálamo e hipocampo de la rata, tanto en animales control como en los sometidos al *kindling* con PTZ.
3. Con el propósito de analizar si la CaM sufre cambios en su contenido tisular durante el fotoperiodo, se harán determinaciones durante la fase de luz y durante la fase de oscuridad.

4. Para analizar la posibilidad de que la CaM participe en la liberación de encefalinas se procederá a desarrollar la técnica de liberación de opioides a partir de las terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas).
5. Una vez caracterizada la preparación de los sinaptosomas, se pretenderá evaluar la liberación *in vitro* de Met y Leu-encefalina en sinaptosomas obtenidos de la amígdala basolateral de la rata bajo condiciones control.
6. Determinar el efecto de los inhibidores de la CaM sobre la liberación *in vitro* de Met y Leu-encefalina en sinaptosomas de amígdala.
7. Analizar la posible participación de la enzima PKC sobre la liberación de encefalinas, usando un agonista de la enzima, el éster de forbol denominado PMA.

3.0 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

3.1.1. Determinación de la concentración de la Calmodulina durante el fotoperiodo.

1. Sujetos: Se utilizó un grupo de 70 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 230-250 g, mantenidas en condiciones temperatura y luz controlada. La temperatura fue de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y la luz en un ciclo de 12 x 12 h, comenzando la fase luminosa a las 06:00 h. El agua y el alimento fueron suministrados *ad libitum*. Este

4. Para analizar la posibilidad de que la CaM participe en la liberación de encefalinas se procederá a desarrollar la técnica de liberación de opioides a partir de las terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas).
5. Una vez caracterizada la preparación de los sinaptosomas, se pretenderá evaluar la liberación *in vitro* de Met y Leu-encefalina en sinaptosomas obtenidos de la amígdala basolateral de la rata bajo condiciones control.
6. Determinar el efecto de los inhibidores de la CaM sobre la liberación *in vitro* de Met y Leu-encefalina en sinaptosomas de amígdala.
7. Analizar la posible participación de la enzima PKC sobre la liberación de encefalinas, usando un agonista de la enzima, el éster de forbol denominado PMA.

3.0 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

3.1.1. Determinación de la concentración de la Calmodulina durante el fotoperiodo.

1. Sujetos: Se utilizó un grupo de 70 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 230-250 g, mantenidas en condiciones temperatura y luz controlada. La temperatura fue de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y la luz en un ciclo de 12 x 12 h, comenzando la fase luminosa a las 06:00 h. El agua y el alimento fueron suministrados *ad libitum*. Este

grupo fue subdividido en dos:

A) Animales epileptizados: 50 animales fueron inyectados diariamente, entre las 10-12 h, con pentilene-tetrazol a una dosis de 30 mg/kg por vía intraperitoneal. Para evaluar el desarrollo del *kindling* químico, los animales fueron observados en sus cajas durante una hora después de la inyección con PTZ. El desarrollo del *kindling* tuvo una duración de 32 días, al término de este periodo, los animales que presentaron todas las fases conductuales del modelo del *kindling* (ver sección de métodos) fueron seleccionados para llevar a cabo la determinación de la concentración de CaM cerebral (n=20).

B) Animales control: 20 animales fueron inyectados con solución salina por vía intraperitoneal, utilizando un volumen variable de acuerdo a su peso corporal.

2. Hora de sacrificio: los animales control y epileptizados fueron sacrificados por decapitación en dos horarios: el primero a las 13:00 h y el segundo a las 01:00h.

En cada horario se utilizaron 10 animales control y 10 experimentales. El cerebro fue removido y procesado como se describe en la sección de métodos.

3.1.2. Liberación *in vitro* de encefalinas a partir de sinaptosomas.

1. Sujetos: Un grupo de ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 230-250 g fueron mantenidas en condiciones temperatura y luz controlada. La temperatura

fue de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y la luz en un ciclo de 12 x 12 h, comenzando la fase luminosa a las 06:00 h. El agua y el alimento fueron suministrados *ad libitum*.

2. Caracterización de la preparación de los sinaptosomas

Con el propósito de comprobar si la preparación de sinaptosomas era funcional, es decir si era capaz de capturar y liberar un neurotransmisor, de responder a la presencia de un agente despolarizante y que la liberación fuera dependiente de calcio, se realizaron los siguientes experimentos:

a. Captura y liberación de ^3H -GABA, utilizando sinaptosomas obtenidos de la amígdala, hipotálamo e hipocampo de la rata.

b. Liberación de ^3H -GABA provocada por la presencia de un agente despolarizante como el potasio [30 mM]. En estos experimentos se colectaron las fracciones basales (antes del potasio), en presencia del potasio y postestímulo (después del potasio).

c. Liberación de ^3H -GABA dependiente de calcio. Se realizaron dos experimentos en presencia del quelante de calcio el EGTA [2 mM]. El grupo control de este experimento fue una preparación que no contenía calcio en el amortiguador.

3. Liberación de péptido opioides a partir de sinaptosomas.

Una vez establecida la funcionalidad de la preparación, se llevaron a cabo los

experimentos de liberación de Met y Leu-Encefalina, así como del Hepta y Octapéptido a partir de los sinaptosomas de la amígdala de la rata. De los péptidos mencionados la Leu-encefalina se encuentra inserta en el precursor de la prodinorfina y de la proencefalina A, el resto únicamente se localiza en la secuencia de la proencefalina A. El objetivo de estos experimentos, fue el de conocer si se producía la liberación de opioides, en qué cantidades y si la liberación era dependiente de calcio utilizando al EGTA como agente quelante.

4. Efecto de un inhibidor de Calmodulina.

Con el propósito de evaluar la posible participación de la CaM en la liberación de Met y Leu-encefalina, los sinaptosomas de la amígdala de la rata fueron incubados con un inhibidor de la calmodulina la trifluoroperazina TFP a una concentración de 40 μg .

5. Curvas dosis-respuesta con dos inhibidores de CaM.

Una vez establecido el efecto del TFP sobre la liberación de Met y Leu-Encefalina, se realizaron los experimentos dosis-respuesta con dos inhibidores de la CaM el TFP y un derivado de la sulfanilamida del compuesto denominado W7. En ambos casos se usaron cuatro diferentes concentraciones molares de los inhibidores.

6. Efecto de un agonista de la enzima PKC.

En función de los resultados con los antagonistas de CaM, se realizaron experimentos en donde se analiza la posible participación de la PKC. El objetivo fue el de analizar si la PKC pudiera también estar involucrada en la liberación de las encefalinas. Para estos experimentos se utilizó a un agonista de la enzima, el éster de forbol denominado PMA [1µg].

3.2. Métodos

3.2.1. Kindling químico con Pentilenetetrazol.

Un grupo de ratas macho de la cepa Wistar fueron sometidas al kindling químico con Pentilenetetrazol (PTZ). Los animales se inyectaron cada 24 h con una dosis de 35 mg/kg de PTZ por vía intraperitoneal. Los animales fueron observados en sus cajas por espacio de una hora después de la inyección. El desarrollo del *kindling* químico fue evaluado siguiendo los parámetros descritos por Ito (70) y Diehl (34). Los criterios conductuales fueron los siguientes: Fase 1) sin movimiento. Fase 2) movimiento de la cabeza "mioclonias", Fase 3) torcedura del tronco y cabeza de la rata. Fase 4) posición de canguro, el animal se para en sus patas posteriores. Fase 5) Crisis tónico-clónicas generalizadas con posición de canguro y caída hacia atrás. La evolución del *kindling* químico se muestra en la

figura 1. De acuerdo a los criterios descritos por Ito y Diehl, los animales deben de presentar hasta la fase V para ser considerados como epileptizados. La fase 5 del *kindling* químico con PTZ presenta un registro electroencefalográfico similar al reportado para el *kindling* eléctrico y al observado en las crisis tónico clónicas en los seres humanos.

3.2.2. Procesamiento de las estructuras cerebrales.

De acuerdo a los lineamientos del diseño experimental, para la determinación de calmodulina en el tejido cerebral, durante el fotoperiodo, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, el cerebro fue extraído con rapidez y las estructuras disecadas. El cuerpo estriado, hipocampo e hipotálamo se disecaron de acuerdo a la técnica descrita por Glowinski e Iversen (46), la amígdala del lóbulo temporal de acuerdo al criterio de Engel y col. (40). Las estructuras fueron congeladas a -20°C , hasta la determinación de calmodulina por medio de la técnica del radioinmunoensayo (RIA).

3.2.3. Preparación de las muestras para la determinación de CaM

El procesamiento de la muestra para la purificación de CaM, se realizó de acuerdo a la técnica descrita por M. Gney y col. (47). A cada una de las muestras de las ratas epileptizadas y controles que se obtuvieron previamente se les añadieron 850

μl del amortiguador A (50 mM Tris-HCl, 3 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, pH 7.4). Las muestras fueron homogeneizadas durante 2 min en un sonicador Ultrasonic. Las fracciones particulada y citosólica se obtuvieron al centrifugar la muestra a 100,000 g durante 60 min a 4°C. La fracción citosólica se hirvió en baño maría (b.m.) durante 4.5 min y se enfrió inmediatamente en baño de hielo. La fracción del citosol fue nuevamente centrifugada durante 10 min a 30,000 g a 4°C. La fracción particulada fue resuspendida en 850 μl del amortiguador A, se hirvió durante 4.5 min en b.m. y se enfriaron en baño de hielo. La muestra fue centrifugada nuevamente a 30,000 g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante recuperado. Los sobrenadantes de la fracción citosólica y de la fracción particulada se almacenaron a -20°C, hasta la determinación de CaM por RIA.

3.2.4. Técnica de Liberación *in vitro* a partir de sinaptosomas.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, el cerebro fue removido con rapidez y la amígdala disecada. La estructura cerebral se depositó en sacarosa 0.32 M en una relación 1:10 a 4°C (54). La amígdala fue homogeneizada a 500 rpm. (8 golpes) y centrifugada a 4,000 rpm durante 12 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado y centrifugado a 12,000 rpm por 12 min a 4°C. Los sinaptosomas

fueron resuspendidos en la solución amortiguadora de incubación (mM): NaCl 119; KCl 4.3; CaCl₂ 1.25; KH₂PO₄ 0.85; MgSO₄ 0.84; NaHCO₃ 24.8; Glucosa 10.0; AOAA 0.1M. Las muestras se incubaron durante 10 min a 37°C, y se añadió el pulso de ³H-GABA (1.12 µCi). La muestra fue incubada nuevamente durante 10 min a 37°C. Una alícuota de 800 µl fue depositada en los filtros Millipore, DAWP (tamaño del poro 0.65 µM). Las cámaras fueron lavadas con el amortiguador de incubación con un flujo continuo de 2.2 ml/min durante 20 min, para eliminar el tritio que no haya entrado en el sinaptosoma. Cuando el lavado se terminó, la velocidad de flujo se redujo hasta 0.5 ml/min. La muestra basal fue recolectada a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min con amortiguador de incubación y se añadió el amortiguador con alto potasio (0.5 ml/min). El exceso de potasio fue retirado y se añadió nuevamente el amortiguador de incubación y la fracción que contiene el alto potasio fue recolectada. Las 3 muestras obtenidas basal, alto potasio y postestímulo fueron recolectadas cada minuto durante 5 minutos. Los resultados se reportaron como el porcentaje de ³H-GABA liberado de los sinaptosomas.

3.2.5. Obtención de anticuerpos contra péptidos opioides.

Se utilizaron conejos macho Nueva Zelanda (3.5-4.5 kg), los cuales se

mantuvieron en jaulas separadas con vigilancia médica, a temperatura ambiente y se les suministró agua y alimento *ad libitum*. El conjugado se preparó a temperatura ambiente, disolviendo 5 mg del péptido, en 10 mg de ASB y 50,000 cpm de un trazador radioactivo (según sea el péptido), en 1 ml de amortiguador de fosfatos 0.05 M a un pH 7.4. Posteriormente, se agregaron 10 μ l de glutaraldehído al 20 % con agitación constante (en un vortex), repitiéndose este procedimiento cada 10 min. Se incubó durante 30 min con agitación cada 5 min. La disolución se aplicó a una columna de cromatografía con Sephadex G-25 fino y se eluyó con amortiguador de fosfatos 0.05 M a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Se colectó el volumen en donde aparece la fracción de la albúmina sérica bovina, observada en un detector UV. Se añadió amortiguador hasta un volumen 1 l ml y se tomó una alícuota para medir la radioactividad incorporada. El volumen total fue separado en alícuotas de 0.5 y 1 ml las cuales fueron congeladas y almacenadas a una temperatura de -20°C . Para inmunizar a los conejos, se tomó una alícuota del conjugado (unión albúmina-péptido) y se emulsificó con igual volumen del Adyuvante Completo de Freund (Sigma Chem. Co.). Esta mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente para formar una emulsión. De la mezcla resultante se inyectan alícuotas de 100 μ l cada una en los cuartos traseros

del animal (zona debidamente rasurada), repitiendo el procedimiento una vez por mes durante 4 meses. A partir del cuarto mes se dieron refuerzos para mantener el título de los antisueros. Los conejos fueron sangrados por la oreja 15 días después de cada inyección para controlar el grado de respuesta inmunológica (se tomó una muestra para el suero control previo al esquema de inmunización). Los animales fueron anestesiados para obtener, por punción cardíaca, la mayor cantidad de sangre posible para procesarla y obtener el suero.

2.2.6. Técnica para la iodación de péptidos opioides

Reacción en tubos Eppendorf de 500 μ l a los cuales se añadieron: 2 μ g del péptido + 10 μ l de amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 7.4. Añadir 200 μ Ci de 125 I y 4 μ l (6 μ g) de cloramina T preparada en el momento y disuelta en amortiguador fosfatos 0.05M pH 7. Agitar durante 30 segundos. Añadir 4 μ l de metabisulfito de sodio, disuelto en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.4. Añadir 40 μ l de amortiguador fosfatos 0.05 M. Tomar una alícuota de 4 μ l para conocer la cantidad total del radiactivo presente en la muestra. La purificación del péptido marcado, se realizó con la técnica de la cromatografía en placa delgada (Merk Kieselgel 60 F 254) en el siguiente sistema de solventes: Butanol: ácido acético: agua (4:1:1). Una vez aplicada la muestra, en un volumen no mayor a los 100 μ l,

la corrida de la muestra se lleva a aproximadamente 3 h.

Para revelar la placa de silica gel, se expuso a una placa de rayos X durante 30 min. Se retiró y se colocó en contacto con el revelador durante 3 min (195 ml de revelador en 1 litro de agua). Se lavó en agua. La placa se colocó en contacto con el fijador (200 ml/litro de agua). En un sistema de solvente como el que se ha descrito, el valor del R_f , confiere la posibilidad de conocer la posición de cada muestra para poder identificarla y separarla. El valor del R_f es característico de cada péptido y se calcula al dividir la distancia recorrida por el solvente entre la distancia recorrida por cada muestra en ambos casos desde el punto de aplicación). Para los péptidos opioides utilizados en el presente trabajo los valores fueron: Met-Encefalina = 0.33; Leu-Encefalina = 0.71; heptapéptido = 0.61; octapéptido = 0.35

Extracción. La banda se cortó en el R_f correspondiente y se depositó en un tubo con 3 ml de una mezcla metanol: agua (1:1). Se agitó vigorosamente durante 3 min. La banda fue centrifugada 3,000 rpm a 4.C durante 5 min. El sobrenadante fue recuperado, evaporado a sequedad y resuspendido en 2 ml de agua destilada. Se tomó una alícuota de 10 μ l para calcular la cantidad de radioisótopo obtenido.

3.2.7. Radioinmunoensayo para los péptidos opioides.

La técnica de radioinmunoensayo (RIA) para encefalinas se realizó de acuerdo al procedimiento de la Tabla 1.

Tabla 1. Radioinmunoensayo de encefalina (los volúmenes se expresan en μ l)

Tubos	Buffer	STD	^{125}I	Ac	Carbón
100%	350	100 agua	100	-----	-----
UI	350	100 agua	100	-----	200
O	350	100 agua	100	100	200
Curva	250	100 Std	100	100	200
Muestra	250	100 muestra	100	100	200

3.2.8. Cuantificación de Calmodulina por Radioinmunoensayo.

Las muestras de CaM fueron cuantificadas por RIA utilizando un estuche comercial New England Nuclear (NEK-018), basados en la técnica descrita por Van Eldik (130) y con el siguiente protocolo:

Añadir a un vaso de precipitado 10 ml de agua destilada, ácido bórico 0.31 g, borato de sodio 0.48 g, EGTA 0.019 g, azida de sodio 0.049 g, cloruro de sodio 0.22 g, albúmina sérica bovina 0.1 g. Mezclar suavemente durante 10 min. Añadir 15 μ l de Tween 20 al 10 %. Mezclar hasta disolver. Ajustar el pH a 8.4. Aforar a 50 ml con agua destilada. Mezclar durante 10 min. El compuesto radioactivo fue

reconstituido al añadir 11 ml del amortiguador del ensayo, se agitó suavemente y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. El radioactivo fue estable durante 2 meses a 4°C. El anticuerpo fue reconstituido con 11 ml del amortiguador de ensayo. Se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. El anticuerpo fue estable durante 2 meses a 4°C. La substancia patrón, de concentración conocida, fue reconstituida en 2 ml del amortiguador del ensayo (1µ/ml) de una muestra precalentada. El esquema de diluciones para la muestra patrón es el siguiente:

Tubo	Conc. (ng/0.1ml)
a Concentrado sin diluir	100.00
b 0.2 ml de a + 0.8 ml amortiguador	20.00
c 0.5 ml de b + 0.5 ml amortiguador	10.00
d 0.5 ml de c + 0.5 ml amortiguador	5.00
e 0.5 ml de d + 0.5 ml amortiguador	2.5
f 0.5 ml de e + 0.5 ml amortiguador	1.25
g 0.5 ml de f + 0.5 ml amortiguador	0.625
h 0.5 ml de g + 0.5 ml amortiguador	0.310

Sólo se utilizaron los tubo b al h

A un vaso de precipitado se les añadieron los siguientes compuestos: ácido bórico 0.34 g, borato de sodio 0.52 g, EGTA 0.021 g, azida de sodio 0.054 g, cloruro de sodio 0.24 g. Se mezcló suavemente durante 10 min, se ajustó el pH a 8.4 y se añadió polietilenglicol (PEG 6000/8000) 2.52 g y harina de arroz 0.22 g. Se

mezcló suavemente para evitar grumos y se añadió, 16 μ l de Tween 20 (10%) y 44 μ l de triton X-100 (10%) La mezcla se llevó a 55 ml con agua destilada y fue mezclada suavemente durante 10 min. Este amortiguador fue usado para reconstituir el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo fue reconstituido al añadir 55 ml al vial que lo contiene, el vial fue lavado 2 ó 3 veces para asegurar una recuperación mayor. El diagrama para la elaboración de la curva patrón y de las muestras para la determinación de CaM se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Radioinmunoensayo de Calmodulina (volúmenes en microlitros)

	Tubo	buffer	Std	muestra	^{125}I	Ac	2do Ac
cpm total	1-2	-----	-----	-----	100	-----	-----
Blanco	3-4	200	-----	-----	100	-----	500
0	5-6	100	-----	-----	100	100	500
Curva	7-20	-----	100	-----	100	100	500
Muestra	21-	-----	-----	100	100	100	500

Los tubos fueron incubados de 18-24 h a 4°C. Se añadieron 500 μ l del segundo anticuerpo a todos los tubos excepto a el que contiene las cpm totales. Se incubó en baño de hielo al menos durante 30 min. Los tubos fueron centrifugados a 4°C, 30 min a 3,000 rpm. Todos los tubos excepto cpm totales fueron decantados, se

descartó el sobrenadante para contar el precipitado. Los cálculos se basaron en la relación (%B/Bo) para cada muestra patrón y cada muestra problema como sigue:

$$\%B/Bo = \text{Cuentas totales de la muestra} \times 100 / \text{Cuentas totales del "0"}$$

La iodación de CaM se efectuó mediante el método de cloramina T. El protocolo utilizado fue el siguiente: disolver 2 µg del antígeno (CaM) en 10 µl en PBS 0.5M, pH 7.4, agregar 200 µCi de ¹²⁵I, añadir 6 µg de cloramina T en 4 µl de PBS. Para evitar que la oxidación sea muy enérgica y altere la estructura del péptido marcado, se requiere de agitar durante 30 segundos exactamente. Añadir 30 µg de metabisulfito de sodio en 4 µl de PBS para detener la reacción de oxidación. Añadir 40 µl de HCl 1N y agitar.

Para separar a la ¹²⁵I-CaM del yodo libre, la muestra de la iodación se pasó a través de una columna de Sephadex G-25 de (100 x 2 cm) previa calibración del volumen muerto y con sustancias patrón de pesos moleculares conocidos. La elución de la muestra se realizó con amortiguador PBS.

3.2.9. Identificación de Calmodulina y encefalinas por HPLC

Con el propósito de identificar y purificar a la CaM presente en el tejido, se utilizó la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). La columna utilizada fue una columna Protein-Pak125 (Waters Associated) de filtración

molecular. El gradiente de tipo isocrático se realizó con una mezcla de acetonitrilo 35% + ácido trifluoroacético 0.1%.

Una alícuota de las muestras provenientes de los perfusados de la liberación, se concentraron y aplicaron a una columna C_{18} fase reversa de 30 cm (Waters Assoc.) con un gradiente de TFA 20 % bomba A y de acetonitrilo 80% bomba B. El flujo de la fase móvil comenzó con los porcentajes señalados y se mantuvo en esas condiciones durante 5 min, para dar inicio al gradiente discontinuo , hasta alcanzar 50% en cada bomba en los siguientes 30 min. Las muestras se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en 500 μ l de agua para ser analizados por RIA. La determinación de proteínas se realizó por medio de la técnica de Lowry (81), con un límite de sensibilidad de 5 μ g usando albúmina sérica bovina como sustancia patrón.

3.2.10. Análisis de Resultados

Los resultados para la determinación de la concentración de calmodulina en el tejido cerebral durante el fotoperiodo y de la liberación de encefalinas a partir de los sinaptosomas, se evaluaron mediante la prueba de "t"-Student. Los resultados se expresan en ng/mg de proteína y representan la media \pm E.S.M. El nivel de significancia aceptado fue de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

El patrón conductual del desarrollo del *kindling* químico se muestra en la figura 1.

La inyección diaria de PTZ produjo el desarrollo gradual y progresivo de las diferentes fases del *kindling*. En el presente trabajo de tesis, el registro de la evolución del *kindling* fue conductual, es decir se tomó en cuenta únicamente la observación directa en las cajas de los animales, sin contar con el registro electroencefalográfico. Por tal razón, una vez que los animales alcanzaron la fase 5 del *kindling* dejamos que estos últimos repitieran esta misma fase al menos 3 veces consecutivas para asegurarnos que habían completado la evolución del *kindling*.

En esta gráfica se muestra el promedio de los animales que presentaron toda la evolución del *kindling* químico. A partir del día 24 aproximadamente, se observa como en general los animales tienen una tendencia a presentar la fase 4 del *kindling*. Durante los siguientes 7 días los animales alcanzaron la fase 5 del desarrollo del *kindling*. Aproximadamente un 30 % de los animales que iniciaron esta serie de estimulación con PTZ, no alcanzaron a desarrollar todas las fases y en consecuencia no fueron tomados en cuenta en este trabajo.

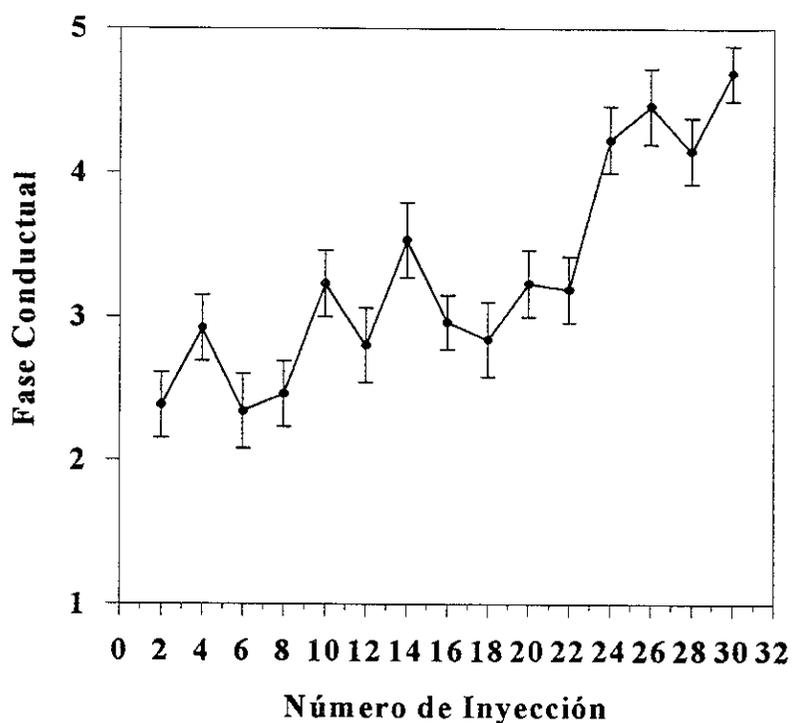


Fig. 1. Evolución conductual del *kindling* químico con PTZ. Cada valor representa la media $\bar{x} \pm$ S.E.M. de 30 animales.

En la figura 2, se muestran los resultados de la identificación de CaM por medio de la técnica de HPLC. El cromatograma mostró que la CaM presente tanto en la fracción del citosol como en la de la membrana, tiene el mismo tiempo de retención a la sustancia patrón utilizada (CaM pura). De acuerdo al patrón cromatográfico

podemos asumir que la CaM en el tejido tiene la misma naturaleza química que la sustancia patrón.

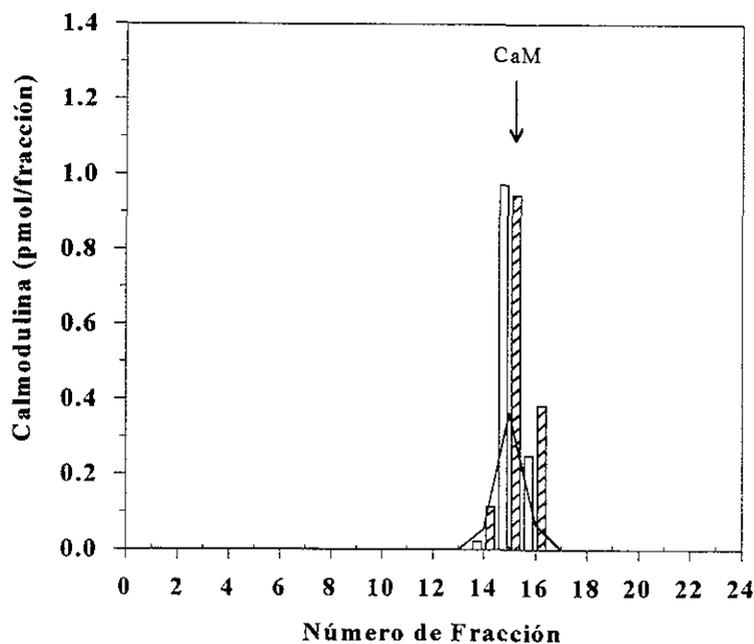


Fig.2. Purificación e identificación de CaM por la técnica de HPLC. Las muestras de la membrana (barras blancas) y del citosol (barras rayadas) fueron inyectadas por separado. La línea continua corresponde a la sustancia patrón. La flecha indica el tiempo de retención de la sustancia patrón.

4.1. Determinación de calmodulina en el tejido cerebral

En la Fig. 3 se observa que el contenido de CaM tanto en el grupo control como en el epileptizado aumentó significativamente durante la fase de obscuridad. No

se registraron diferencias en la concentración de CaM al comparar el grupo control vs el grupo sometido al *kindling* con PTZ.

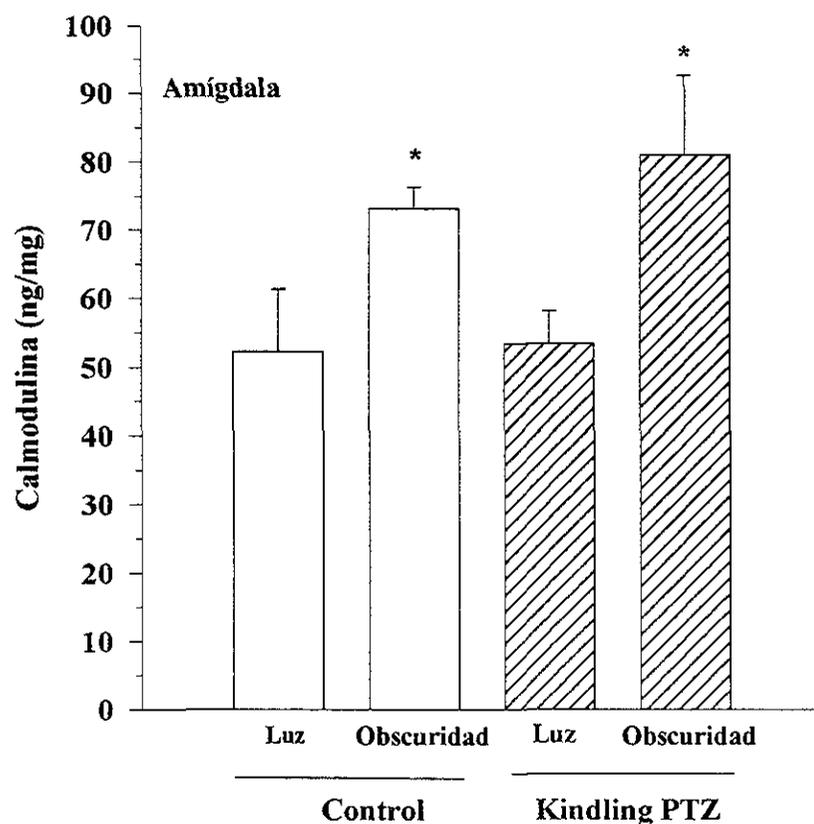


Fig.3. Contenido total de CaM en la amígdala (citósol + membrana), durante la fase de luz y la de oscuridad. Cada valor es el promedio $\bar{x} \pm$ S.E.M. de 10 animales. Los valores de la significancia fueron calculados usando la prueba de "t"-Student * $p < 0.05$ cuando se compara con el grupo de la luz.

En la figura 4 se muestra el contenido de CaM en el hipocampo. Durante la fase de obscuridad los animales control, presentaron un incremento significativo en el contenido de CaM (>110 %) al compararlo con el grupo sacrificado durante fase de luz. El grupo sometido al kindling presentó una leve tendencia a incrementar el contenido tisular de CaM, sin embargo el cambio no fue significativo.

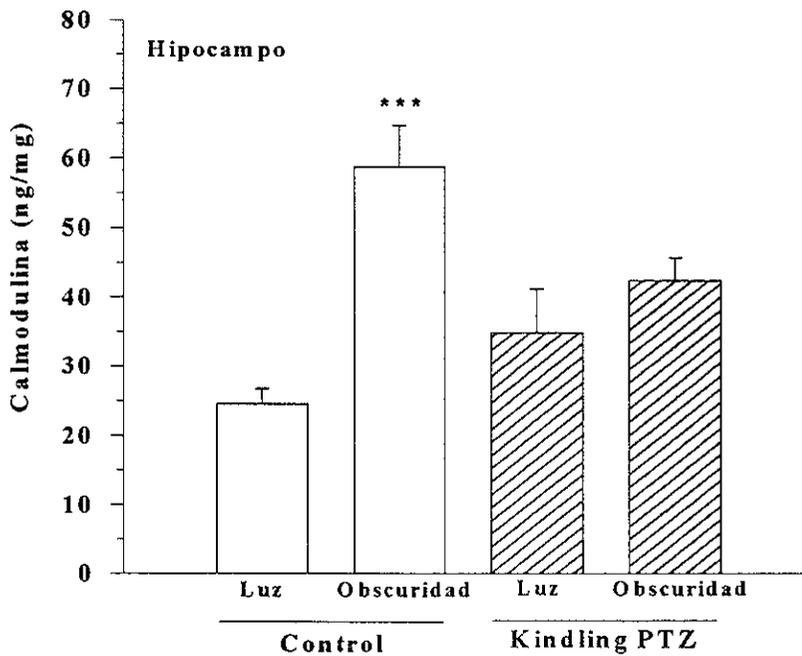


Fig.4. Concentración de CaM en el hipocampo (citosol + membrana). Cada valor es el promedio $\bar{x} \pm$ S.E.M. de 10 animales. Los valores de la significancia fueron calculados usando la prueba de "t"-Student. *** $p < 0.001$ cuando se compara con el grupo de luz.

En el hipotálamo, durante la fase de oscuridad, ambos grupos, el control y el experimental mostraron una ligera tendencia a incrementar el contenido de CaM (9%). Sin embargo, este incremento no fue significativo. Durante la fase de luz los valores de ambos grupos fueron semejantes (Fig.5).

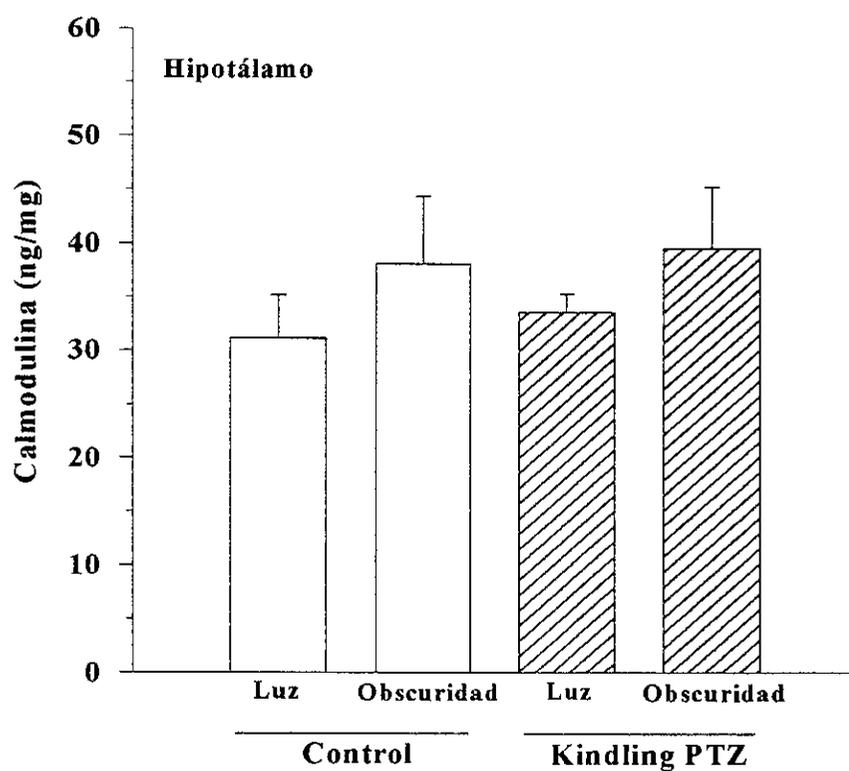


Fig.5. Concentración de CaM en el hipotálamo (citosol + membrana) durante la fase de luz y oscuridad. Cada valor es el promedio $\bar{x} \pm S E M$ de 10 animales.

La concentración de la CaM en las fracciones de membrana y del citosol, obtenidas de la amígdala, hipocampo e hipotálamo del cerebro de la rata, se muestran en la Tabla 3. El primer resultado relevante mostró que para ambos grupos experimentales y en todas las estructuras cerebrales analizadas, la fracción del citosol es la que mayor contenido tiene de CaM. En el grupo control se observó que durante la fase de obscuridad la concentración de CaM en el citosol aumentó con respecto a la fase de luz en forma significativa en la amígdala (>44%) y en el hipocampo (>150%), en el hipotálamo el incremento fue mayor al 36% pero el cambio no fue significativo. Al comparar los valores obtenidos en la membrana del grupo control durante la fase de obscuridad contra la fase de luz, encontramos que el contenido de CaM aumentó significativamente en el hipocampo (>90%), la amígdala presentó un incremento no significativo y en el hipotálamo el contenido CaM se redujo aunque no significativamente. En el grupo de ratas tratadas con PTZ, la cantidad de CaM presente en el citosol durante la fase de obscuridad aumentó con respecto a la fase de luz en todas las estructuras. Sin embargo, estos cambios no fueron significativos. En la fracción de membrana, los animales epileptizados mostraron un incremento significativo en la amígdala (>70%) e hipotálamo (>40%).

En el hipocampo la concentración de CaM se redujo aunque no significativamente. Al comparar los resultados obtenidos entre el grupo control contra el epileptizado, solamente encontramos dos cambios significativos; el contenido de CaM en la fracción del citosol del hipocampo se redujo (<26%), y en la fracción de membrana del hipotálamo aumentó (>86%). En ambos casos los cambios se produjeron durante la fase de oscuridad.

Tabla 3 Contenido de CaM en el cerebro de la rata

Control	Fase de Luz		Fase de Oscuridad	
	citosol	membrana	citosol	membrana
Amígdala	36.69 ± 6.8	15.47 ± 2.24	52.87 ± 2.2*	20.28 ± 1.86
Hipocampo	19.58 ± 1.4	4.93 ± 0.80	50.72 ± 5.01**	8.02 ± 0.96*
Hipotálamo	25.22 ± 4.3	5.85 ± 0.46	34.38 ± 6.6	3.88 ± 0.69
Kindling				
Amígdala	35.68 ± 3.1	17.74 ± 1.59	51.35 ± 8.7	29.6 ± 2.8**
Hipocampo	27.40 ± 4.8	7.41 ± 1.56	37.22 ± 2.2 ^a	5.18 ± 1.13
Hipotálamo	28.30 ± 1.8	5.23 ± 0.33	32.28 ± 5.6	7.25 ± 0.6 ^{ab}

Tabla 3. Contenido de CaM en el cerebro de la rata. Los resultados son expresados como ng/mg de proteína. Cada medición representa la media $\bar{x} \pm$ S.E.M. de una n=10 ratas. Los valores de la significancia fueron calculados usando la prueba de "t"-Student. Los asteriscos indican las diferencias significativas cuando se comparan las muestras del citosol y de la membrana obtenidas durante la fase de luz vs las fracciones respectivas obtenidas durante la fase de oscuridad (*p<0.05, **p<0.005). Las letras a y b indican diferencias significativas cuando se compara la fracción del grupo control vs la correspondiente en el grupo *kindling* (^ap<0.05, ^bp<0.01).

4.2. Liberación *in vitro* de opioides.

Como se mencionó en el diseño experimental, la preparación de los sinaptosomas debe de reunir varios requisitos para considerarlos como funcionales, es decir deben de reunir varios criterios neuroquímicos para poder usarlos, entre los principales se encuentran el de ser capaces de capturar y liberar a un neurotransmisor, de responder a la presencia de un agente despolarizante y a que la liberación del neurotransmisor sea dependiente de calcio.

En las figuras 6, 7 y 8 se muestra la caracterización de la preparación de los sinaptosomas a partir de la amígdala, hipotálamo e hipocampo de la rata. Utilizando ^3H -GABA como neurotransmisor, los resultados mostraron que la liberación tiene 3 componentes principales; 1) la liberación basal, es decir la cantidad de neurotransmisor que se libera sin la presencia del agente despolarizante. 2) Cuando la preparación recibe el estímulo del agente despolarizante, en nuestro ensayo se usó el potasio [30 mM], la liberación de ^3H -GABA se incrementó significativamente con respecto a la basal. 3) Al retirar del medio de incubación al agente despolarizante, la liberación regresó a valores semejantes a la basal.

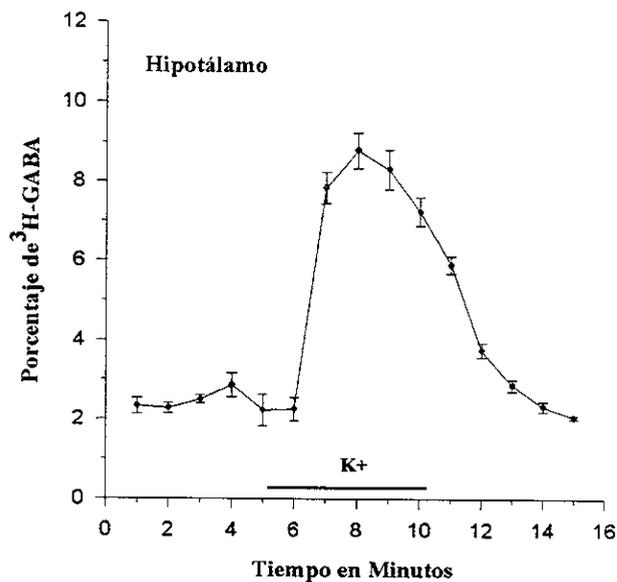


Fig. 6. Liberación *in vitro* de $^3\text{H-GABA}$ de sinaptosomas obtenidos del hipotálamo. $n=6 \pm$ S.E.M. [$\text{K}^+=30$ mM]; [$\text{Ca}^{2+}=1.25$ mM]

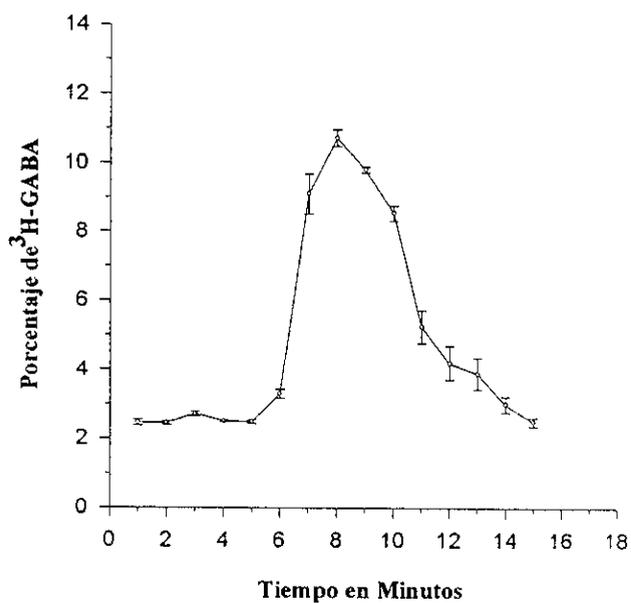


Fig. 7. Liberación *in vitro* de $^3\text{H-GABA}$ de sinaptosomas de la amígdala. $n= 6 \pm$ S.E.M. El tiempo de estimulación fue de 5 minutos. [$\text{K}^+=30$ mM]; [$\text{Ca}^{2+}=1.25$ mM.]

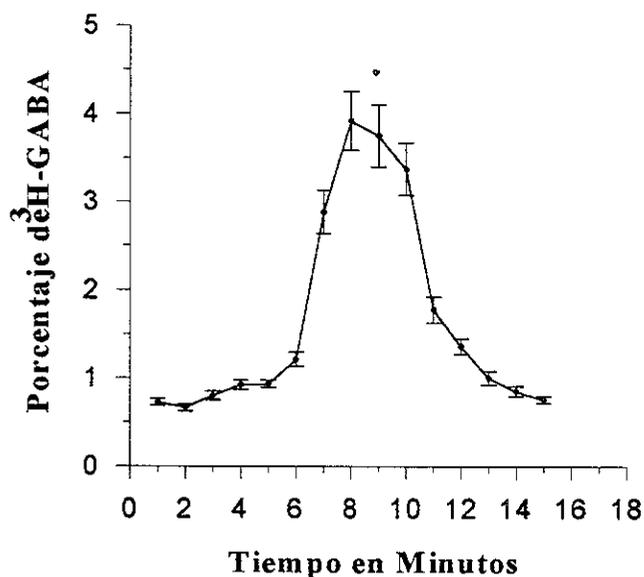


Fig.8. Liberación *in vitro* de ³H-GABA de sinaptosomas obtenidas a partir del hipocampo n=6 ± S.E.M. [K⁺= 30 mM]; [Ca²⁺=1.25 mM].

Con el propósito de analizar la funcionalidad de los sinaptosomas con respecto a la presencia y ausencia de calcio, como factor determinante para la exocitosis, se muestran en la figura 9, los resultados de la liberación de ³H-GABA en presencia y ausencia del EGTA [2 mM]. Los resultados muestran que en presencia de EGTA la liberación del neurotransmisor durante el periodo de estimulación con el potasio,

se redujo un 45 % con respecto al control.

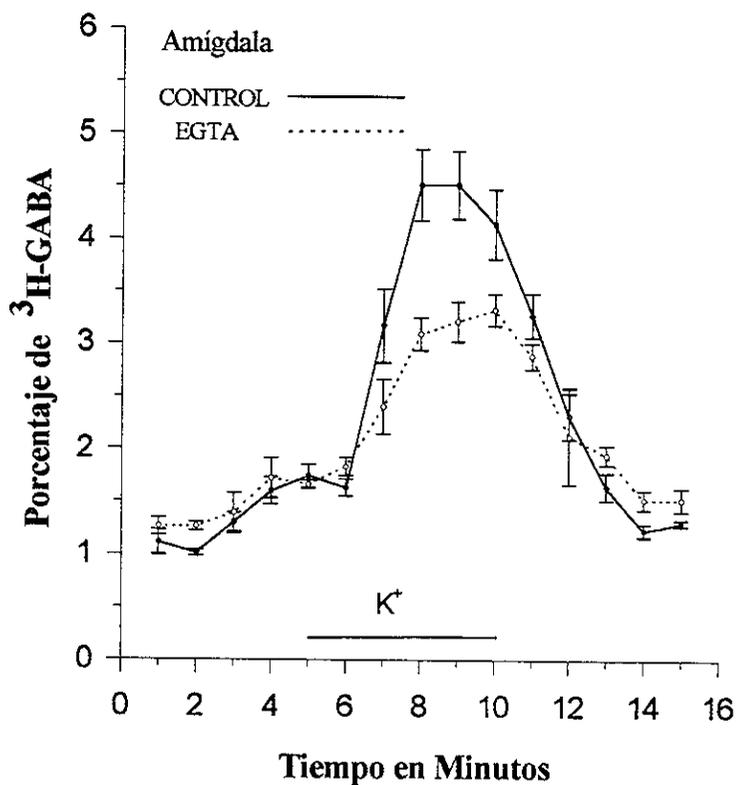


Fig. 9. Liberación *in vitro* de $^3\text{H-GABA}$ de sinaptosomas de la amígdala en el grupo control, en presencia y ausencia de EGTA [2 mM], [K^+]=30 mM]. $n=2 \pm$ S.E.M.

Los datos presentados de las últimas 4 figuras, nos permiten asumir que la preparación de sinaptosomas obtenida es viable para ser utilizada.

Bajo los mismos criterios descritos previamente para la liberación de ^3H -GABA, en las figuras 10 y 11 se presentan los experimentos de la liberación para la Leu y Met-enkefalina a partir de los sinaptosomas de la amígdala. Los resultados muestran que ambos pentapéptidos poseen una liberación basal, una vez que se añadió el agente despolarizante (potasio 30 mM) al medio de incubación, la liberación de encefalinas se incrementó significativamente (>300%) con respecto al basal. Una vez retirado el potasio del medio de incubación (postestímulo=PE), la liberación de encefalinas regresa a los valores basales de liberación. Previamente, nuestro grupo ha reportado que la liberación de encefalinas es calcio dependiente. La presencia del quelante del calcio, el EGTA [2 mM], redujo significativamente la liberación de ambas encefalinas (7).

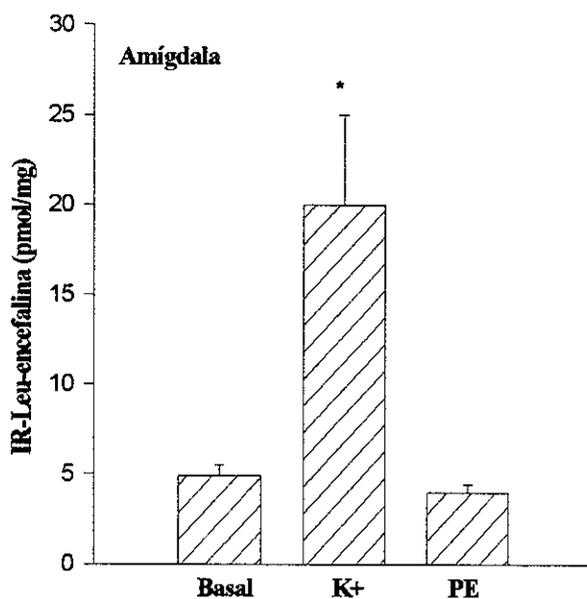


Fig.10. Liberación *in vitro* de Leu-Enkefalina a partir de sinaptosomas de la amígdala control. Los valores son el promedio $\bar{x} \pm$ S.E.M. de una $n=6$. * $p<0.001$ con respecto al valor basal. $[CaCl_2=1.25mM]$, $[K^+=55mM]$ (K^+ =alto potasio, PE= postestímulo)

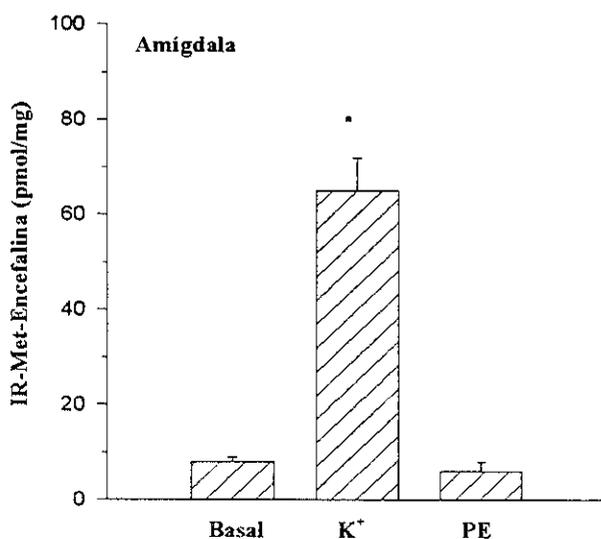


Fig.11. Liberación *in vitro* de Met-Enkefalina. La leyenda es similar a la figura 10. * $p<0.001$

4.3. Efecto del Trifluoroperazina inhibidor de la Calmodulina sobre la liberación de opioides.

En la figura 12 se muestra el efecto de la trifluoroperazina (TFP) a una concentración de 40 μM , sobre la liberación de Met-enkefalina a partir de sinaptosomas de la amígdala de la rata. Estos resultados nos indican que la presencia del inhibidor de la CaM fue capaz de reducir en un 50% aproximadamente la liberación de Met-enkefalina provocada por el potasio.

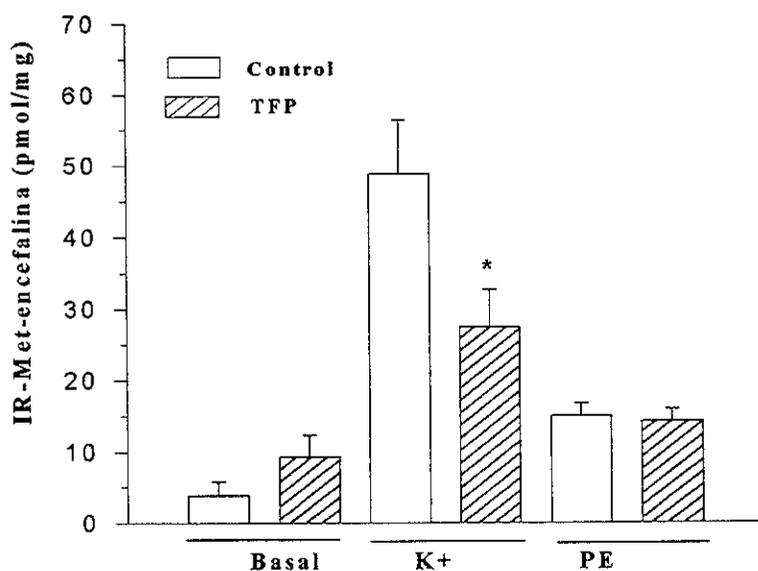


Fig.12. Efecto del TFP sobre la liberación *in vitro* inducida por el potasio, de Met-Enkefalina a partir de sinaptosomas. [TFP=40 μM]; [K⁺=55mM]; [CaCl₂=1.25 mM]. Los valores son la media \bar{x} + S.E.M. de 6 cámaras *p<0.05 con respecto al control con potasio. (PE= postestímulo).

En la Fig. 13 se muestra la liberación *in vitro* de Leu-encefalina, a partir de sinaptosomas de la amígdala. Los resultados muestran que el TFP a una concentración de 40 μM no fue capaz de inhibir la liberación de la Leu-encefalina.

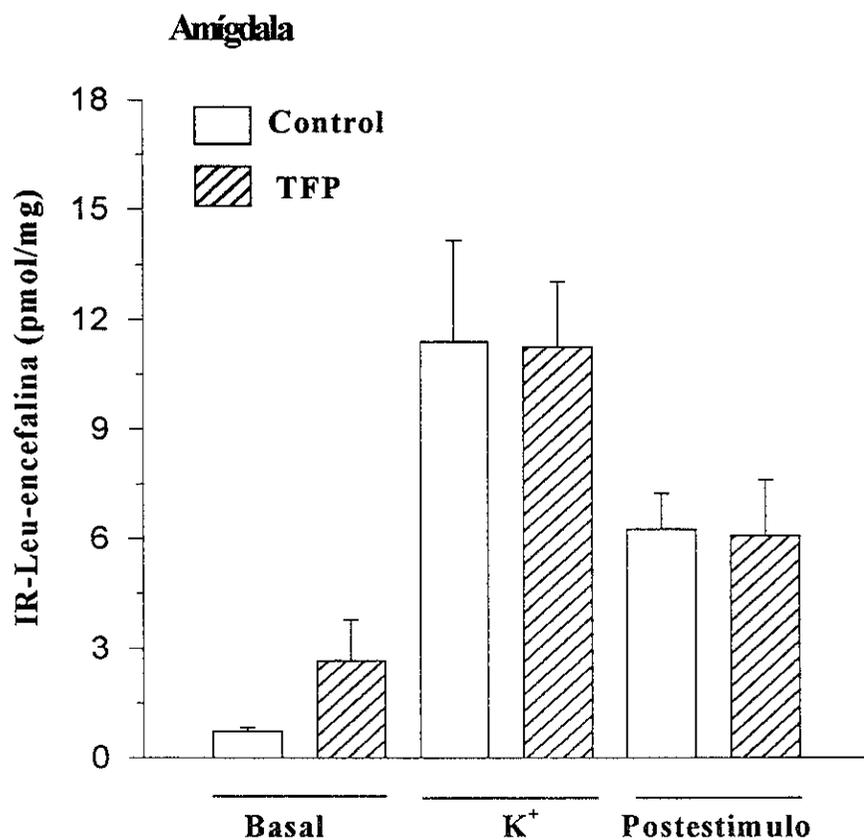


Fig. 13. Efecto del TFP sobre la liberación *in vitro* de Leu-encefalina a partir de sinaptosomas de amígdala. Las condiciones son similares a la figura 12.

En la figura 14, encontramos que la liberación del heptapéptido en presencia del TFP se redujo significativamente ($> 50\%$) con respecto al control estimulado con potasio. El valor basal y postestimulado no presentaron cambios con respecto al control.

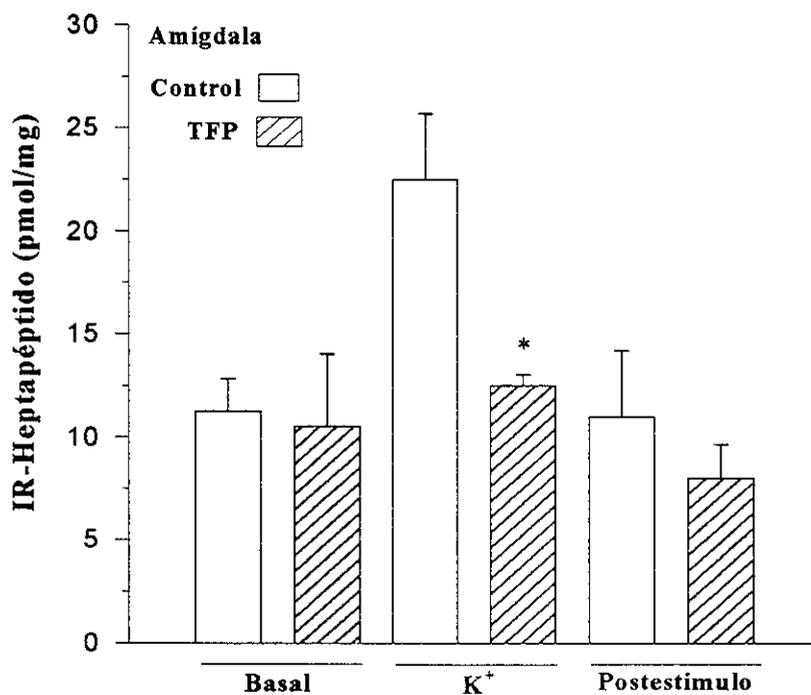


Fig. 14. Efecto del TFP sobre la liberación *in vitro* del heptapéptido a partir de sinaptosomas de la amígdala. * $p < 0.05$ con respecto al control estimulado con potasio. Las condiciones son similares a la figura 12.

En la Fig.15 observamos que la liberación *in vitro* del octapéptido a partir de los sinaptosomas de la amígdala, por efecto del TFP, se redujo aproximadamente en un 27% con respecto al control. Sin embargo, los cambios no alcanzaron significancia estadística.

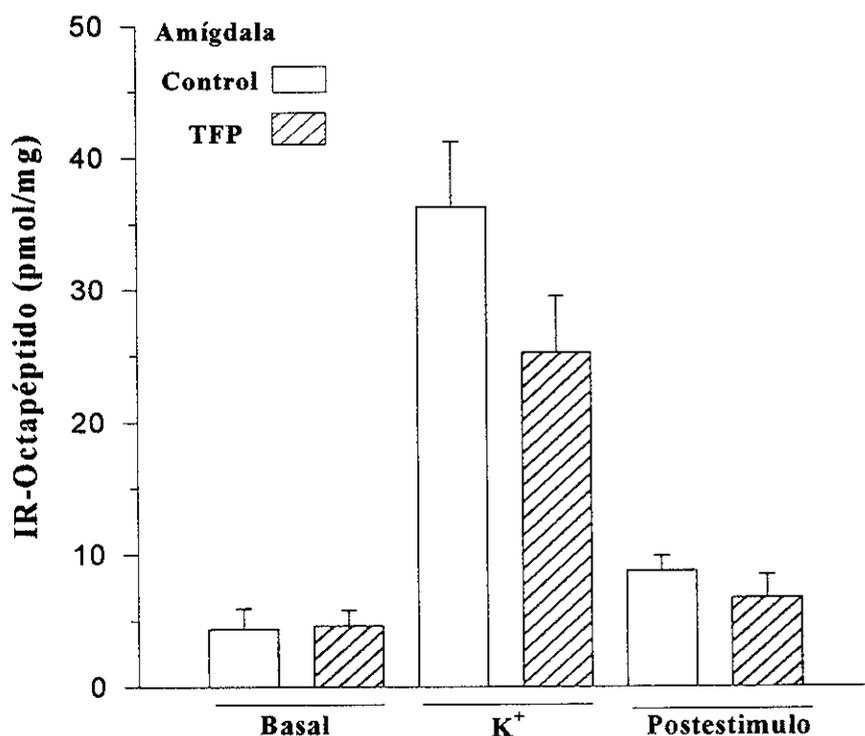


Fig.15. Efecto del TFP sobre la liberación *in vitro* del octapéptido a partir de sinaptosomas de la amígdala. Las condiciones son similares a la figura 12.

4.4. Efecto del PMA sobre la liberación de opioides.

Como se mencionó en la introducción, la enzima PKC se encuentra relacionada con la liberación tanto de neurotransmisores clásicos, como de neuropéptidos. Para analizar la posible participación de la PKC sobre la liberación *in vitro* de Met- y Leu-encefalina, utilizamos al agonista de la PKC, el éster de forbol denominado PMA. En la figura 16 se muestra el efecto del PMA [$1\mu\text{M}$] sobre la liberación *in vitro* de Met-encefalina, a partir de sinaptosomas de la amígdala de la rata. Los resultados muestran que la presencia del PMA, no modificó la cantidad de Met-encefalina liberada en condiciones basales. Durante la estimulación con potasio, la liberación de Met-encefalina mostró un ligero aumento por efecto del PMA, pero no fue significativo. Una vez retirado el potasio del medio de incubación, la concentración de Met-encefalina, regresó a los valores basales de la liberación.

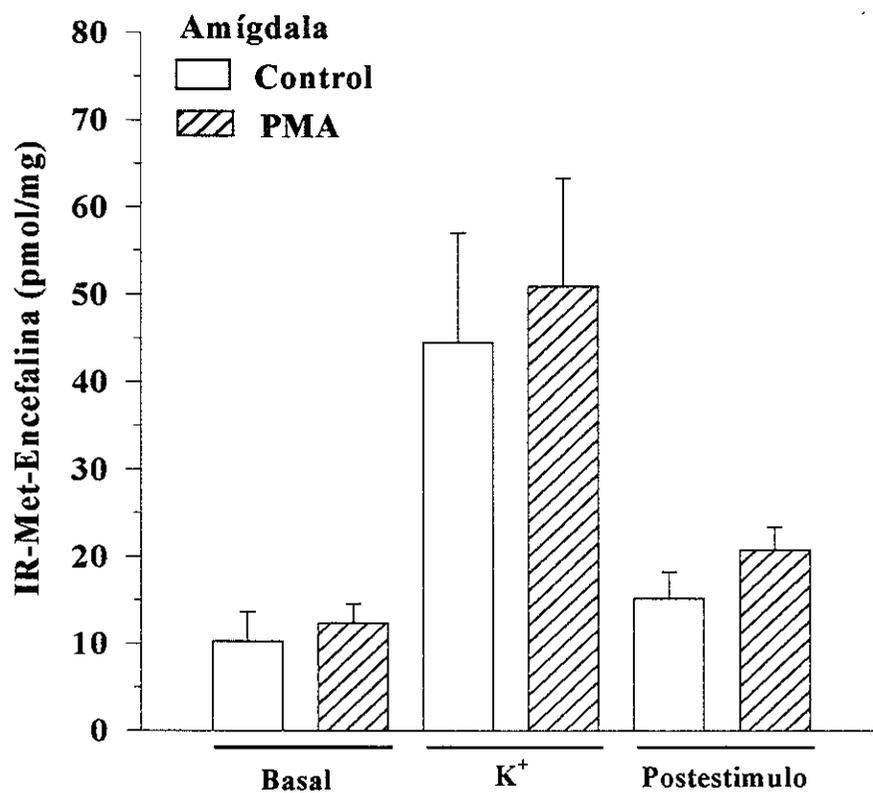


Fig. 16. Efecto del PMA sobre la liberación *in vitro* de Met-Enkefalina a partir de sinaptosomas de la amígdala basolateral de la rata. [PMA=1 μ M]; [K⁺= 55 mM]; [CaCl₂= 1.25 mM]. Cada valor representa el promedio $\bar{x} \pm$ S.E.M. de 6 determinaciones.

En contraste con lo observado para la Met-enkefalina el PMA [1 μ M], fue capaz de aumentar significativamente la liberación *in vitro* de la Leu-enkefalina provocada por el potasio. Los resultados nos muestran que el éster de forbol aumentó en un 50% aproximadamente la liberación de la enkefalina, al compararlo con el control sin PMA. Tanto el valor basal, como el postestímulo no sufrieron cambios con respecto al grupo control (Fig. 17).

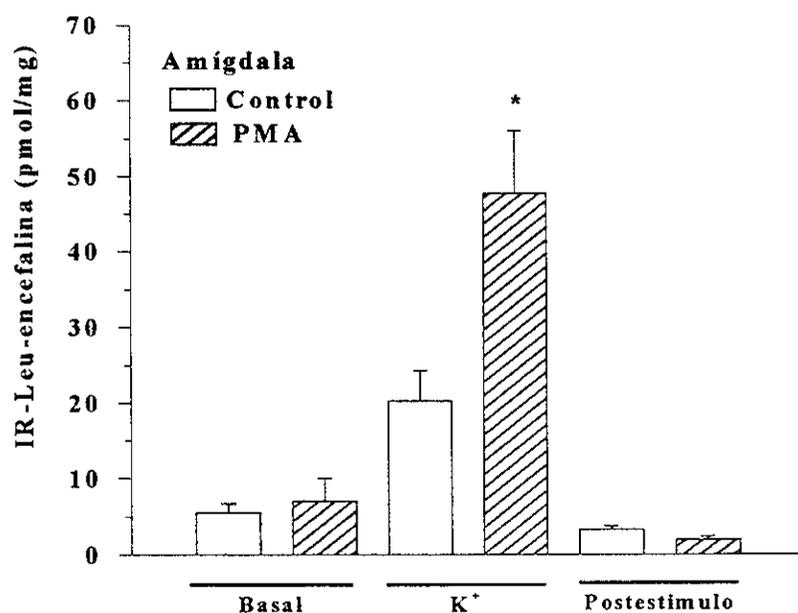


Fig. 17. Efecto del PMA sobre la liberación *in vitro* de Leu-Enkefalina en la amígdala basolateral de la rata. Las condiciones experimentales son similares a los de la figura 16. Cada valor representa la media $\bar{x} \pm$ S.E.M. de 6 determinaciones. * $p < 0.03$ con respecto al valor basal.

4.5. Efecto del TFP y W7. Curvas Dosis-respuesta.

Con el propósito de analizar el efecto de los inhibidores de la CaM sobre la liberación de encefalinas, decidimos realizar las curvas dosis-respuesta utilizando dos fármacos capaces de inhibir la actividad de la CaM. En la figura 18, se muestra el efecto de dos antagonistas de la CaM, los compuestos W7 y el TFP sobre la liberación *in vitro* de Met-encefalina. Los resultados muestran que en todas las dosis utilizadas de los fármacos, la liberación de Met-encefalina disminuye con respecto a su valor control (0). A partir de una dosis de 10^{-6} M o mayor los cambios fueron significativos.

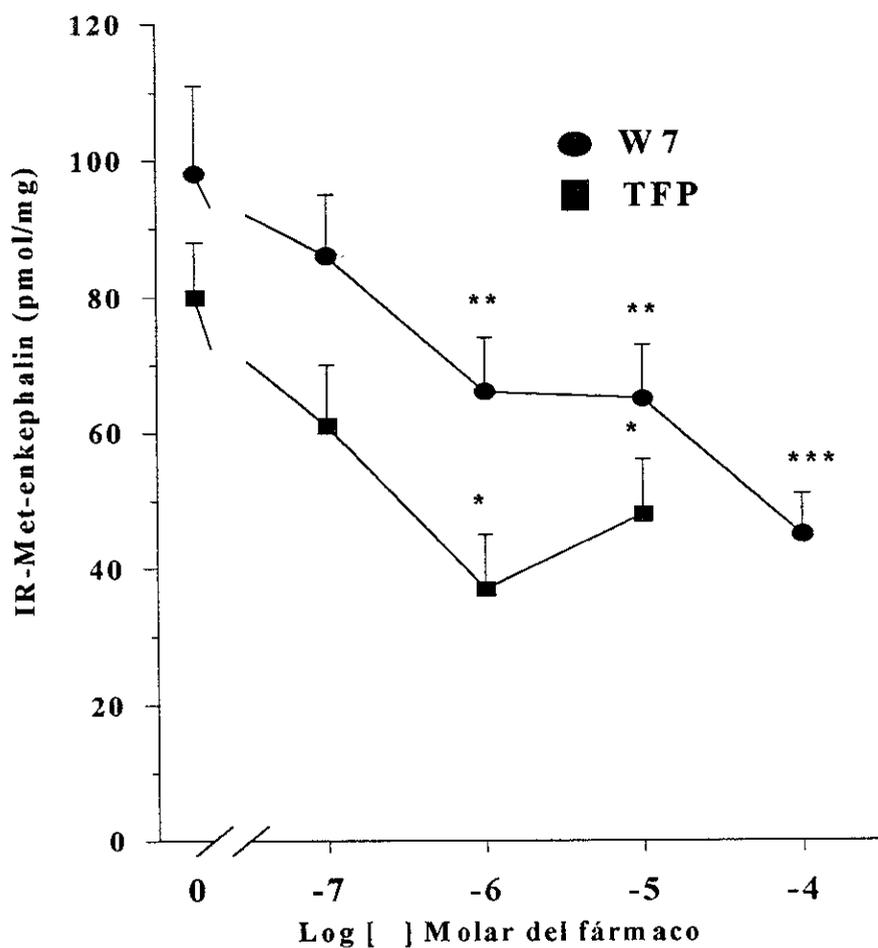


Fig.18. Curva dosis-respuesta del efecto del TFP y W7, sobre la liberación *in vitro* de Met-Enkefalina a partir de los sinaptosomas de la amígdala de la rata. Los datos corresponden a la liberación provocada por el potasio [$K^+=55$ mM]. Cada valor es la media $\bar{x} \pm$ S.E.M. de 6 determinaciones. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ co respecto al control (valor 0)

En la figura 19 se muestra el efecto de los dos inhibidores de la CaM sobre la liberación de Leu-encefalina a partir de sinaptosomas de la amígdala de la rata. Los resultados obtenidos demuestran que ninguno de los dos fármacos utilizados es capaz de modificar significativamente la liberación de Leu-encefalina.

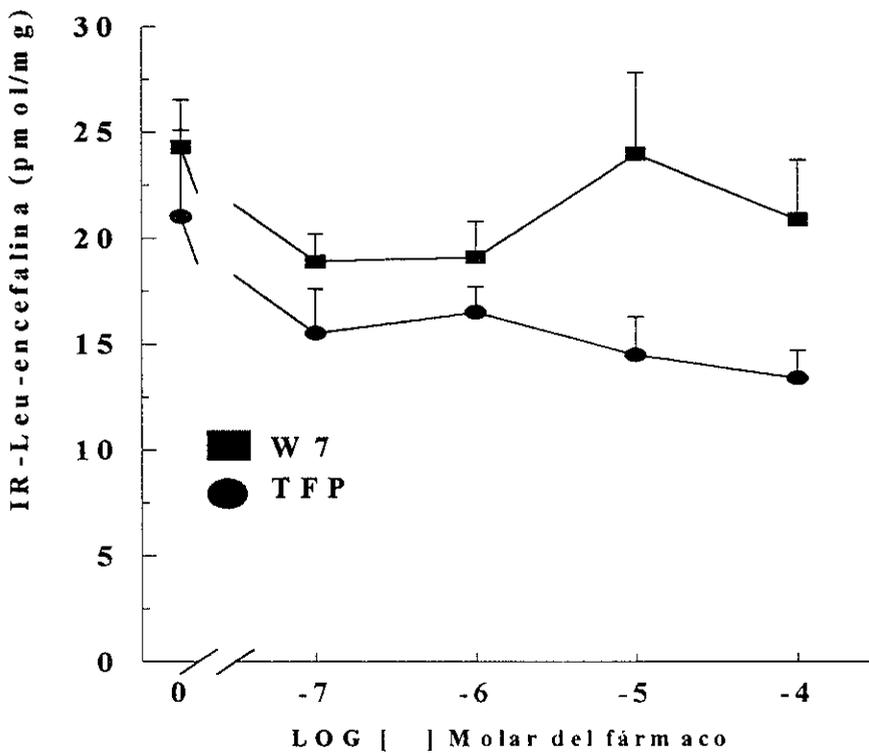


Fig. 19. Curva dosis-respuesta del efecto de TFP y W7 sobre la liberación *in vitro* de Leu-Encefalina de los sinaptosomas de la amígdala de la rata. Los datos corresponden a la liberación provocada por el potasio [$K^+=55$ mM]. Cada valor es el promedio $\bar{x} \pm$ S.E.M de 6 determinaciones

. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo sugieren que : 1) En la amígdala de los animales control y de los que fueron sometidos al *kindling* con PTZ, el contenido de CaM se modificó en función del fotoperiodo. Los resultados nos muestran que durante la fase de oscuridad la CaM alcanzó su concentración máxima. 2) En el hipocampo el contenido de CaM aumentó en la fase de oscuridad en la rata control, en los animales sometidos al *kindling* no se observaron cambios. Finalmente en el hipotálamo no se observaron cambios en la concentración de CaM tanto en la fase de luz como en la de oscuridad para ambos grupos experimentales. 3) La CaM participa en la liberación presináptica de Met-enkefalina, más no de Leu-enkefalina. 4) La enzima PKC puede estar involucrada en la liberación de Leu-enkefalina.

Con el propósito de analizar los cambios en el contenido de la CaM en las fracciones subcelulares de la amígdala, hipotálamo e hipocampo de la rata, se midieron por separado la fracción del citosol y la de membrana en los animales control y sometidos al *kindling* con PTZ. Los valores de la Tabla 3, muestran dos rasgos importantes; 1) en ambos grupos de estudio, la mayor concentración de CaM se realizó en la fracción del citosol y 2) el contenido de CaM como tendencia general aumentó tanto en la fracción de membrana como en la del citosol

celulares la MEL incrementa específicamente las concentraciones del RNAm que codifica para la CaM (10,101). Por lo tanto, los datos obtenidos en la presente investigación en donde se demuestra que la concentración de CaM aumentó durante la fase de obscuridad en algunas de las regiones del cerebro de la rata analizada, apoya la hipótesis de que la MEL pudiera modular la síntesis de CaM de acuerdo al fotoperiodo. Sin embargo, el mecanismo molecular que subyace a las variaciones en la síntesis y catabolismo de la CaM cerebral asociadas con el fotoperiodo permanecen desconocidas. Actualmente, se reconoce la participación de la CaM en el *kindling* eléctrico a través de la activación de la CaM-Cinasa II. El *kindling* eléctrico produce un incremento en la autofosforilación de la CaM-Cinasa II del hipocampo. Este incremento se encuentra relacionado con los diferentes estadios del *kindling*, es decir que a medida que el fenómeno del *kindling* avanza la autofosforilación también, por lo que se ha propuesto que la CaM pudiera estar involucrada en el desarrollo y mantenimiento del *kindling* eléctrico (141). Por otro lado, a la MEL se le adjudican propiedades anticonvulsivantes (1,2), así como a los fármacos como las fentoínas y benzodiazepinas, drogas que son capaces de inhibir *in vitro* la actividad de la CaM-Cinasa II (30,34). Estudios *in vitro* han demostrado que la MEL ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad y la autofosforilación de la CaM-Cinasa II, antagonizando a la CaM (9). Por lo tanto, es posible que durante

la fase de oscuridad la MEL pueda modular el contenido cerebral de la CaM y que las propiedades anticonvulsivantes de la hormona se relacionen con el antagonismo de la CaM. Es un hecho conocido que la frecuencia de crisis convulsivas aumenta durante la fase de oscuridad y que los opioides endógenos pueden ser agentes que protejan al organismo reduciendo la severidad y propagación de la crisis convulsiva. Los opioides presentan un ritmo circádico bien establecido, en donde la mayor concentración y liberación de opioides se produce durante la fase de oscuridad y la mínima en las primeras horas de la mañana (3). En este trabajo se demuestra que la CaM puede incrementar selectivamente la liberación *in vitro* de Met-enkefalina, pero no de Leu-enkefalina, en terminales nerviosas aisladas de la amígdala de la rata. Se ha propuesto que este efecto puede estar mediado por la activación de la CaM-KII (5). Los resultados del presente trabajo nos sugieren que la síntesis de CaM durante la fase de oscuridad puede no solamente estar asociada al fotoperiodo, sino también con la liberación de neuropéptidos. De acuerdo con nuestros resultados, la CaM pudiera participar en forma selectiva con la liberación presináptica de Met-Enkefalina, pero no de Leu-Enkefalina. El mecanismo a través del cual regula dicha liberación parece estar modulada por el complejo Ca^{2+} -CaM, vía la activación de la CaM-Cinasa II. Recientemente se ha demostrado que la PKC y la calmodulina se encuentran involucradas con la secreción de neuropéptidos como la bombesina y la

colecistoquinina (13,23,91,120).

A finales de la década de los setentas Pickel y col (105) demostraron en el cerebro de la rata la presencia de encefalinas en vesículas sinápticas electrodensas. Estudios posteriores en el cerebro de los anfibios como el *Ambystoma mexicanum*, se demostró que en la hipófisis de esta especie, las encefalinas se localizan tanto en fibras como en poblaciones neuronales distintas (81,128).

En este trabajo, encontramos que los antagonistas de CaM inhiben selectivamente la liberación de Met-encefalina, del hepta y octapéptido, pero no de Leu-encefalina.

A partir de estos datos se podría proponer que la liberación de los opioides pudiera estar regulada por dos sistemas celulares involucrados en la liberación de neurotransmisores. Por un lado, se conoce que el complejo Ca^{2+} -CaM activa a la enzima CaM-Cinasa II presente en el cerebro (47), que se localiza en la membrana de las vesículas sinápticas (49). Una vez que la enzima se encuentra activa es capaz de fosforilar a las moléculas de sinapsina I, responsables (cuando se encuentran fosforiladas) de unir a las vesículas sinápticas con los elementos del citoesquelto (11, 125). Cuando la sinapsina I es fosforilada por la CaM-cinasa II, se liberan las vesículas sinápticas migran hacia la membrana plasmática de la terminal nerviosa donde se produce la exocitosis con la consecuente liberación del neurotransmisor. Datos obtenidos en esta tesis muestran que dos antagonistas de la CaM, el TFP, y

el W7, son capaces de inhibir la liberación de la Met-enkefalina, hepta- y octapéptido. Es interesante señalar que los péptidos mencionados se originan de un mismo precursor, la proenkefalina A. En cambio, la Leu-enkefalina, que no se afecta por la presencia de los inhibidores de la CaM, puede tener su origen tanto en la proenkefalina A, como en la prodinorfina. Nuestros resultados sugieren que al bloquear a la CaM con TFP o W7, se inhibe tanto la activación de la CaM-quinasa II, como la fosforilación de la sinapsina I, lo que en consecuencia reduciría la cantidad de Met-enkefalina liberada y de los péptidos provenientes de la PA como el hepta- y octapéptido. El hecho de que la liberación de Leu-enkefalina no se modifique por la presencia de los antagonistas de la CaM, sugiere que este péptido pudiera localizarse en vesículas sinápticas distintas o bien, en poblaciones neuronales diferentes a las que contienen Met-enkefalina (79), por lo que la liberación de IR-LE podría llevarse a cabo por un mecanismo independiente de la CaM. Esta hipótesis se apoya por el hecho de que el PMA (agonista de la PKC), aumentó la liberación *in vitro* de Leu-enkefalina, sin modificar a la Met-enkefalina.

El precursor de las enkefalinas, la proenkefalina A, contiene 4 copias de Met-enkefalina, y una copia de Leu-enkefalina, del heptapéptido y octapéptido, de tal manera que la proporción molar de cada uno de los péptidos mencionados en el tejido del cerebro de la rata es de 4:1:1:1. Sin embargo, después de que los animales

han sido sometidos al kindling tanto eléctrico como químico, estas proporciones se alteran pero no de forma equivalente, es decir la proporción anterior se rompe. Este efecto lo hemos reportado previamente tanto en el tejido cerebral como la liberación *in vitro* de los opioides (4,7,121,131,132). Es factible que la modificación de la proporción tisular y liberada, pueda comenzar a ser explicada si consideramos que tanto la CaM-Cinasa II como la PKC pueden ejercer un control selectivo sobre la liberación de encefalinas. Una de las posibles explicaciones de la liberación diferencial de las encefalinas podría sustentarse en sus características de distribución, concentración y afinidad por las enzimas involucradas en el proceso de secreción. Tanaka y col. (123) han descrito la existencia de al menos 10 isoformas de PKC, distribuidas selectivamente en el cerebro. La PKC $_{\gamma}$ solamente se ha localizado en el cerebro y médula espinal (112), y PKC $_{\beta I}$ en las presinápsis de las estructuras del sistema límbico (66). Es importante señalar que la afinidad de una enzima y de sus isoformas por un substrato no es la misma, tampoco se presentan en la misma concentración, ni tienen la misma distribución en las distintas regiones del cerebro o del sistema nervioso periférico (47,110,123). Si bien es conocido que las enzimas mencionadas se encuentran en las células nerviosas tanto centrales como periféricas, su actividad, localización, concentración y expresión, difieren en las distintas poblaciones neuronales, otorgando cualidades específicas a la comunicación neuronal

tanto normal como patológica.

Conclusiones

Los datos del presente trabajo demuestran que la concentración de CaM posee un ritmo circádico. Durante la fase de oscuridad el contenido tisular de la proteína aumenta con respecto a la fase de luz, en particular en la fracción del citosol. Estos datos demuestran por vez primera que la síntesis de CaM se encuentra vinculada al fotoperiodo. Los animales sometidos al *kindling* presentaron un efecto similar, es decir durante la fase de oscuridad en la fracción del citosol es en donde encontramos un mayor contenido de CaM con respecto a la fase de luz. Sin embargo, al comparar a los animales control con los epileptizados los cambios fueron discretos, lo cual nos sugiere que la síntesis de CaM podría no estar relacionada con la hipersensibilidad de las neuronas de los sujetos epileptizados.

Por otro lado, los datos obtenidos nos indican que la CaM se encuentra involucrada en la liberación de Met-Encefalina, los inhibidores de la CaM como la trifluoroperazina y el compuesto denominado W7 fueron capaces de inhibir significativamente la liberación de Met-encefalina, pero no de Leu-encefalina. La liberación de este último péptido puede estar regulada por la enzima PKC.

El agonista de esta enzima el éster de forbol denominado PMA fue capaz de producir un incremento significativo de la Leu-encefalina y no así de la Met-encefalina. En

resumen: 1) la síntesis de CaM se encuentra sujeta al fotoperiodo, 2) las concentraciones de la CaM se modifican en forma discreta en animales epileptizados al compararlos con los animales control, lo cual nos sugiere que el estado de hipersensibilidad de la neurona no necesariamente está relacionado con la síntesis de CaM. 3) la CaM se encuentra asociada a la liberación de Met-enkefalina y la enzima PKC con la de la Leu-enkefalina.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Albertson TE., Peterson SL., Stark LG., Larkin ML., Winters W. The convulsant properties of melatonin on kindled seizures in rats. *Neuropharmacology*. 20:61-66 (1981).
2. Antón-Tay F., Díaz JL., Fernández-Guardiola A. On the effects of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implications. *Life Sci*. 10: 841-850 (1971).
3. Asai M, Vindrola O., Zubieta M., Talavera E., Massarini A., Linares G. Diurnal variations of IR-Met-Enkephalin in the rat brain of pentylentetrazol-kindled rats. *Brain Res*. 442: 101-107 (1988).
4. Asai M., Zubieta M., Matamoros G., Linares G., Agustín P. Diurnal variations of opioid peptides and synenekphalin in vitro release in the amygdala of kindled rats. *Neuropeptides* 32: 293-299, (1998).
5. Asai M., Benítez-King G., Gutiérrez R. Presynaptic opioid peptide release could be mediated by calmodulin in nerve terminals. 24 th, Annual Meeting of Neuroscience. Abs. 379.16 Miami Beach Fla. USA (1994).
6. Asai M., Gutiérrez R. Neurobiología de los péptidos opioides. *Salud Mental* 17(2): 30-43 (1994).

7. Asai M. Liberación in vitro de encefalinas durante la depresión postictal y actividad interictal. *Salud Mental* 17:30-43, (1994).
8. Benítez-King G., Huerto-Delgadillo L. and Antón-Tay F. Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and NIE-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res.* 557:289-292.
9. Benítez-King G., Antón-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49: 635-641 (1993).
10. Benítez-King G., Huerto-Delgadillo L., Sámano-Coronel L., Antón-Tay F. Melatonin effect on cell growth and calmodulin synthesis in MDCK and NIE-115 cells . *Adv. Pineal Res.* 7:57-61 (1994).
11. Benfenatti F., Valtorta F., Rubenstein JL., Gorelick FS., Greengard P. Synaptic vesicle-associated Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II is a binding protein for synapsin I. *Nature* 359: 417-420, (1992).
12. Brailowsky S., Silva-Barrat C. y Naquet R. Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigación experimental. *Salud Mental* 12(1): 53-62 (1989).
13. Breukel A., Wiegant V., Lopes da Silva F., Ghijsen EJ. Presynaptic modulation of cholecystokinin release by protein kinase C in rat hippocampus . *J. Neurochem.* 70: 341-348, (1998).

14. Brini M., Carafoli E. Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* 53:354-370 (2000).
15. Brownstein J.M., Farber D.B., Micevych P.E., Lasher R. and Wasterlain C.G. Kindling induced changes in calmodulin kinase II immunoreactivity. *Brain Res.* 524:49-53 (1990).
16. Brownstein J.M. Farber D. and Wasterlain C. Decreased calmodulin kinase activity after status epilepticus. *Neurochem. Res.* 13(1): 83-86 (1988).
17. Burgoin S., Casselin F., Artaud F., Glowinski J., Hamon M. In vivo modulations by GABA-related drugs of met-enkephalin release in basal ganglia of the cat brain. *Brain Res.* 248: 321-330, (1982).
18. Caldecott-Hazard S., Shavit Y., Ackermann R.F., Engel J.Jr., Friederickson R.C.A. and Liebeskind J.C. Behavioral and electrographic effects of opioids on kindled seizures in rats. *Brain Res.* 251:327-333 (1982).
19. Carafoli E., Penniston JT. The calcium signal. *Sci. Am.* 253(5):70-78, (1985).
20. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56:395-433 (1987).
21. Chang M.M., Leeman S.E. and Niall H.D. Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Biol.* 232: 86-87, (1971).

22. Chen YA., Scales SJ., Scheller RH. Calcium regulation of exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* May. In press (2001).
23. Chen YA., Duvvuri V., Schulman H., Scheller RH. Calmodulin and protein kinase C increases Ca (2+)-stimulated secretion by modulating membrane-attached exocytic machinery *J. Biol. Chem.* 274:26469-26476 (1999).
24. Cheung W. Cyclyc 3', 5'-nucleotid phosphodiesterase: demonstration of an activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38:533-538 (1970).
25. Cohen P., Burchell J., Foulkes P., Cohen A. and Nairn A. Identification of the Ca²⁺-dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorilase kinase. *FEBS Lett.* 92:287-293 (1978).
26. Corcoran, M., Ursted H., McCaughran J. and Wada J.A. Frontal lobe kindling in the rat. *Can. J. Neurol. Sci.* 2:501-508 (1975).
27. Corda MG., Giorgi O., Longoni B., Orlandi M., Biggio O. Decrease in the function of the gamma-amminobutyric acid-coupled chloride channel produced by repeated administration of pentylenetetrazol to rats. *J. Neurochem.* 55: 1216-1221; (1990).
28. Cottrell G.A. and Bohus B. Immediate and long-term effects of opiate antagonist on postical behaviour following amygdala kindling in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 141:417-421 (1987).

29. Cottrell G.A., Nyakas C. and Bohus B. Hippocampal kindling-induced after discharge and behavioural depression: immediate and long-term attenuation by opiate antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 150: 1-8 (1988).
30. DeLorenzo R., Freeman W., Yohe W. Maurer S. Stimulation of Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release and presynaptic nerve terminal protein phosphorylation by calmodulin and calmodulin-like protein isolated from synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1838-1842 (1979).
31. DeLorenzo R. Calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Fed. Proc.* 41:2265-2272 (1982).
32. De Lorenzo RJ., Freeman SD. Phenytoin inhibition of calcium-dependent protein phosphorylation in synaptic vesicles. *Neurology* 27:375:378 (1977).
33. DeLorenzo RJ, Burdette S, Holderness J. Benzodiazepine inhibition of the calcium-calmodulin protein kinase system in brain membrane. *Science* 213: 546-549 (1981).
34. Diehl R., Smialowski A. and Gotwo A. Development and persistence of kindled seizure after repeated injections of pentylenetetrazol in rats and guinea pigs. *Epilepsia* 25: 506-510 (1984).
35. Dunkley PR: autophosphorylation of neuronal calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II. *Molec. Neurobiol.* 5:179-202 (1991).

36. Engel J. Jr., Katzman R. Facilitation of amygdaloid kindling by lesions of the *stria terminalis*. *Brain Res.* 122: 137-142 (1977).
37. Engel J. Jr. and Ackerman R. Interictal EEG spikes correlate with decreased, rather than increased epileptogenicity in amygdaloid kindling rats. *Brain Res.* 190:543-548 (1980).
38. Engel J. Jr., Bandler R., Griffith N.C. and Caldecott Hazard S. Neurological evidence for epilepsy-induced interictal disturbances. *Advances in Neurology* Vol. 55, Raven Press, N.Y. 1991, pp 97-111.
39. Engel J. Jr., Ackerman R., Caldecott-Hazard S. and Chugani HT. Do altered opioid mechanisms play a role in human epilepsy? In: *Fariello P. and Engel J. (Eds), Neurotransmitters, seizures and Epilepsy II.* Raven Press, N.Y. 1984 pp. 263-274.
40. Engel J. Jr., Sharpless NS. Long-lasting depletion of dopamine in rat amygdala induced by kindling stimulation. *Brain Res.* 136:381-386 (1977).
41. Eroundu NE, Kennedy MB. Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase in rat brain. *J. Neurosci.* 5:3270-3277 (1985).
42. Fernández-Guardiola A., Fernández Mas R., Rocha L., Gutiérrez R. Frequency-and time-domain EEG topographic analysis of the amygdala kindling evolution in the cat. In: JA Wada (Eds) *Kindling 4*, Plenum Press,

- New York, pp 185-196, (1990).
43. Fernández-Guardiola A., Rocha L., Pellicer F., Gutiérrez R., Calvo JM. Massed amygdaloid kindling in encephale-isolet cats: its facilitation by naloxone. *Epilepsy Res.* 4:55-62 (1991).
 44. Fisher R. Animal models of the epilepsies. *Brain Res. Rev.* 14:245-278 (1989).
 45. Frenk H., Engel J. Jr., Ackerman R., Shavit Y. and Liebeskind J. Endogenous opioids may mediate postictal behavioral depression in amygdaloid-kindling rats. *Brain Res.* 167:435-440 (1979).
 46. Glowinski J., Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J. Neurochem.* 13:655-669 (1966).
 47. Gney ME. Calmodulin in neurotransmitter and hormone action. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:45-70 (1993).
 48. Goodard G., McIntyre D. and Leech C. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* 25:295-330 (1969).
 49. Greengard P., Valtorta F., Czernik A., Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259:780-785 (1993).
 50. Griffith N., Engel J. and Bandler R. Ictal enduring interictal disturbances in emotional behaviour in an animal model of temporal lobe epilepsy. *Brain*

- Res. 400:360-364 (1987).*
51. Gubler U., Seeburg P., Hoffman B., Gage LP., Udenfriend S. Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature 295: 206-208, (1982).*
 52. Guillemin R. Biochemical and physiological correlates of hypothalamic peptides. The new endocrinology of the neuron. *In The Hypothalamus. S Reichlin R.J., Baldessarini, and J.B. Martin eds. New York Raven Press pp 155-194 (1978).*
 53. Gutiérrez R. Synaptic interactions in a newly identified excitatory synapse of *Helix aspersa*: concurrent enkephalinergic and GABAergic modulation. *Brain Res. 667: 243-254 (1994).*
 54. Hajós F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.93:485-489 (1975).*
 55. Hanson PI., Schulman H. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Biochem. 61:559-601 (1992).*
 56. Hardy C., Panksepp J., Rosii J. Naloxone facilitates amygdaloid kindling in rats. *Brain Res. 194: 293-297 (1980).*
 57. He X., Yang F., Xie Z., Lu B. Intracellular Ca (2+) and Ca (2+)/calmodulin-dependent kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release

- by neurotrophin-3. *J. Cell Biol.* 149:783-792 (2000).
58. Heilbrun L. and Wiercinski J. The action of various cations on muscle protoplasm *J. Cell Comp. Physiol.* 29:15-32 (1947).
59. Henriksen SJ., Bloom FE., Ling N., Guillemin R. Induction of limbic seizures by endorphin and opiate alkaloids: electrophysiological and behavioral correlates. *Neurosci Abstr.* 3:293 (1977).
60. Herrera D., Peterson M. and Robertson H. A calmodulin antagonist retards the development of kindling and reduces the production of c-fos protein following a kindling stimulus. *Neurosci. Abstr. Vol. 1 pp* 573 (1988).
61. Hikada H., Asano M. and Tanaka T. Activity-structure relationship of calmodulin antagonist Naphthalensulfonamide derivatives. *Mol. Pharmacol.* 20:571- 578 (1981).
62. Hokfelt T., Johansson O., Ljungdahl A., Lundberg JM., Schultzberg M. Peptidergic neurons. *Nature* 284:515-521 (1980).
63. Hokfelt T. Neuropeptides in perspective: The last ten years. *Neuron* 7:867-879 (1991).
64. Hokfelt T., Broberger C., Zhi-Qing D., Sergeyev V., Ubink R., Diez M. Neuropeptides- an overview. *Neuropharmacology* 39:1337-1356 (2000).

65. Hong JS., Guillin JC., Yang TY., Costa E. Repeated electroconvulsive shock and the brain content of endorphins. *Brain Res.* 177:273-278 (1979).
66. Hosoda K., Saito N., Kose A. Immunocytochemical localization of β I-subspecies of protein kinase C in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1393-1397 (1989).
67. Hughes J., Kosterlitz H., Fothergill L., Morgan B., Morris H. Identification of two related pentapeptides from the bovine brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 255:577-579 (1975).
68. Iadarola MJ., Flores CM., Yang HYT. Release of [Met5]-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 immunoreactivity into rat cerebrospinal fluid by electroconvulsive shock. *Biochem. Pharmacol.* 36: 801-802, (1987).
69. Iadarola MJ, Shin C., McNamara J., Yang HYT. Changes in dynorphin, enkephalin and cholestykinin content of hippocampus and substantia nigra after amygdala kindling. *Brain Res.* 365: 185-191 (1986).
70. Ito T., Hori M., Yoshida K. and Shimuzu M. Effect of anticonvulsants on seizure developing in the course of daily administration of pentetrazol to rats. *Eur. J. Pharmacol.* 45:165-172 (1977).
71. Jianguo C., Xuekong X. A study on opioid peptides in CSF of patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* 6: 141-145, (1990).

72. Johanning K., Mathis P., Lindber I. Processing site blockade results in more efficient conversion of proenkephalin to active opioid peptides. *J. Biol. Chem.* 271: 27871-27878 (1996).
73. Jones B., Shively JE., Kilpatrick D., Kojima K., Udenfriend S. Enkephalin biosynthetic pathway: A 5300-dalton adrenal polypeptide that terminates at its COOH end with the sequence [Met]-enkephalin-Arg-Gly-COOH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1313-1315, (1982).
74. Kanamatsu T., Obie J., Grimes L. Kainic acid alters the metabolism of Met-enkephalin and the level of dynorphin A in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 6:3094-3102, (1986).
75. Kelsey J.E. and Belluzzi J.D. Endorphin mediation of post-ictal effects of kindled seizures in rats. *Brain Res.* 253:337-340 (1982).
76. Klee CB. Concerted regulation of protein phosphorylation and desphosphorylation by calmodulin. *Neurochem. Res.* 16:1059-1065 (1991).
77. Ko GY., Ko ML., Dryer SE. Circadian regulation of cGMP-gated cationic channels of chick retinal cones. Erk MAP kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neuron* 29:255-266 (2001).
78. La Porte DC., Wierman BM., Storm DR. Calcium-induced exposure of a hydrophobic surface on calmodulin. *Biochemistry* 19:3814-3819 (1980).

79. Larson L., Childers S., Snyder S. Met- and Leu-enkephalin immunoreactivity in separate neurons. *Nature* 282: 407-409 (1979a).
80. Lee PHK., Zhao D., Xie CW. Changes of proenkephalin and prodynorphin mRNAs and related peptides in rat brain during the development of deep prepyriform cortex kindling. *Molec. Brain Res.* 6: 263-273, (1989).
81. León-Olea M., Sánchez-Alvarez M., Piña AL., Bayón A. Evidence for enkephalin and endorphin immunoreactive cells in the anterior pituitary of the Axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J. Comp. Neurol.* 305:412-420 (1991).
82. Liston D., Vanderhaeghen JJ., Rossier J. Presence in brain of proenkephalin-immunoreactive protein which does not contain enkephalin. *Nature* 302: 62-65, (1983).
83. Llinás R., Gruner JA., Sugimori M., McGuinness TL., Greengard P. Regulation by synapsin I and Ca²⁺-Calmodulin-dependent protein kinase II of transmitter release in squid giant synapse. *J. Physiol.* 436:257-282 (1991).
84. Lowry OH., Rosenbrough J., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275 (1951).
85. Manalan A., Klee S. Calmodulin. *Adv. Cyclic Nucleotide Phosphoryl. Res.* 18: 227-278, (1984).

86. McGinty JF., Kanamatsu T., Obie J. Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity but decreases dynorphin A like immunoreactivity in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 71: 31-36, (1986).
87. Marcum J., Dedman B., Brinkley B. and Means A. Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3771-3775 (1982).
88. Means A. Molecular mechanisms of action of calmodulin. *Recent Prog. Horm. Res.* 44:223-259 (1988).
89. Means A., Tash J. and Chafouleas. Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol. Rev.* 62:1-39 (1982).
90. Miller R. Peptides as neurotransmitters: focus on the enkephalins and endorphins. *Pharmacol. Ther.* 126: 73-109 (1981).
91. Moore ED., Ring M., Scriven DR, Smith VC., Meloche RM., Buchan AM. The role of protein kinase C isozymes in bombesin-stimulated gastrin release from human antral gastrin cells. *J. Biol. Chem.* 274: 22493-22501 (1999).
92. Morgan J. and Curran T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* 322:552-555 (1986).

93. Morgan J., Cohen D.R., Hempstead J.L. and Curren. Mapping patterns of c-fos expression in the central Nervous System after seizure. *Science* 237:192-197 (1987).
94. Mucha R.F., Pinel J.P. Postseizure inhibition of kindled seizures. *Exp. Neurol.* 54: 266-282 (1977).
95. Naranjo JR., Iadarola MJ., Costa E. Changes in the dynamic state of brain proenkephalin-derived peptides during amygaloid kindling. *J. Neurosci. Res.* 16: 75-87 (1986).
96. Ngozi E., Kennedy MB. Regional distribution of Type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J. Neurosci.* 5:3270-3277 (1985).
97. Nestler E., Greengard P. Protein Phosphorylation in the brain. *Nature* 305; 583-588 (1983).
98. Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S. Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovin adrenal preproenkephalin. *Nature* 295:202-206 (1982).
99. Obrietan K., Impey S., Smith D., Athos J. Circadian regulation of cAMP response elements-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J. Biol. Chem.* 274:17748-17756 (1999)

100. Obrietan K., Impey S., Storm DR. Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat. Neurosci.* 8:693-700 (1998).
101. Ortega A., López I., Benítez-King G., Antón-Tay F. Melatonin increases Calmodulin mRNA levels in MDCK and N1E-115 cell lines. 1st. Locarno, International Meeting on Neuroendocrinology. The pineal gland in relation with the immune system and cancer. Abstr. P-65, 1993.
102. Osborne H., Hollt V., Herz A. Potassium-induced release of enkephalins from rat striatal slices. *Eur. J. Pharmacol.* 48:219-221 (1978).
103. Otero-Siliceo E. *Epilepsia Experimental. Series en Neurología No 2.* 1991.
104. Ouimet CC., McGuinness TL, and Greengard P. Immunocytochemical localization of calcium/calmodulin dependent protein kinase II in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. :USA* 81: 5604-5608 (1984).
105. Pickel VM., Joh T., Reis K., Leeman S. Miller R. Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons. *Brain Res.* 160: 387-400 (1996).
106. Pert CB., Kuhar MJ., Snyder S. Autoradiographic localization of the opiate in the rat brain. *Life Sci.* 16:1849-1854 (1975).

107. Post RM., Putman F., Contel NR., Goldman B. Electroconvulsive seizures inhibit amygdala kindling; implications for mechanisms of action in affective illness. *Epilepsia* 25: 234-239, (1984).
108. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49:654-664, (1993).
109. Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of blood on the concentration of the heart. *J. Physiol. London* 4:29-42 (1983).
110. Robinson PJ. The role of Protein kinase C and its neuronal substrates dephosphin, B-50, and MARCS in neurotransmitter release. *Molecular Neurobiology* 5: 87-125, (1991).
111. Rouille Y., Duguay SJ., Lund K., Furuta M., Gong Q., Lipkind G. Steiner Proteolytic processing mechanism in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Frontiers in Neuroendocrinology* 16:322-361 (1995).
112. Saito N., Kikawa U., Nishizuda Y., Tanaka C. Distribution of Protein kinase C-like immunoreactive neurons in rat brain. *J. Neurosci.* 8:369-382 (1988).
113. Shally A.V., Arimura A. and Kastin A. Hypothalamic regulatory hormones. *Science* 179: 341-350 (1973).

14. Shavit Y., Caldecott-Hazard S., Liebeskind JC. Activating endogenous opioid system by electroconvulsive shock or footshock stress inhibits recurrent kindled seizures in rats. *Brain Res.* 305: 203-207 (1984).
15. Sobue K., Ichida S., Yoshida H., Yamazaki R. and Kakiuchi S. Occurrence of a Ca^{2+} - and modulator protein-activatable ATPase in the synaptic plasma membranes of the brain. *FEBS Lett.* 99:199-201 (1979).
16. Steiner D.F. The protein convertases. *Curr. Op. Chem. Biol.* 2:31-39 (1998).
17. Stern As., Jones BN., Shively JE., Stein S., Udenfriend S. Isolation of the opioid heptapeptide Met-enkephalin ($\text{Arg}^6\text{-Phe}^7$) from bovine adrenal medullary granules and striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 6680-6683, (1979).
18. Stoclet J.D., Gerard D., Kilhoffer M.C., Lugnier C., Miller R. and Schaeffer P. Calmodulin and its role in intracellular calcium regulation. *Prog. Neurobiol.* 29:321-364 (1987).
19. Stone WS., Eggleton CE., Berman RF. Opiate modification of amygdaloid-kindled seizures in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16: 751-756 (1982).
20. Takahashi A., Tanaka S., Miwa Y., Yoshida H., Ikegami A. Involvement of calmodulin and protein kinase C in cholecystokinin release by bombesin from STC-1 cells. *Pancreas* 21:231-239, (2000).

121. Talavera E., Omaña-Magaña I., Asai M. and Condés-Lara M. Regional brain IR-Met-, and IR-Leu-enkephalin concentrations during progress and full electrical amygdaloid kindling. *Brain Res.* 485:141-148 (1989).
122. Tanaka T., Hikada H. Hydrophobic regions function in calmodulin enzyme(s) interactions. *J.Biol. Chem.* 255:11078-11080 (1980).
123. Tanaka C., Nishizuka Y. The Protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:551-567 (1994).
124. Thureson-Klein A. Exocytosis from large and small dense cored vesicles in noradrenergic nerve terminals. *Neuroscience* 10: 245-252 (1983).
125. Trifaro JM., Vitale ML. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *TINS* 16(11):466-472 (1993).
126. Turner AJ. Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays in Biochemistry. Vo. 22: 69-119* (1986).
127. Uhl GR., Kuhar MM-, Snyder S. Enkephalin containing pathway: amygdaloid efferents in the stria terminalis. *Brain Res.* 149: 224-228 (1978).
128. Vallarino M., Thoumas JL., Masini MA., Trabucchi M., Chatrel N., Vaundry H. Immunocytochemical localization of enkephalins in the brain of the African lungfish, *Protopterus annectens*, provides evidence for differential distribution of Met-enkephalin and Leu-Enkephalin. *J. Comp. Neurol.* 396:

- 275-287 (1998).
129. Vaughan PF., Walker JH., Peers C. The regulation of neurotransmitter secretion by protein kinase C. *Mol. Neurobiol.* 18:125-155, (1998).
130. Van Eldik LJ., Watterson DM. Reproducible production and characterization of anti-calmodulin antisera. *Ann. NY Acad. Sci.* 356: 437-438 (1980).
131. Vindrola O., Briones R., Asai M. and Fernández-Guardiola A. Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 21:39-43 (1981).
132. Vindrola O., Briones R., Asai M., Fernández-Guardiola A. Brain Content of Leu⁵- and Met⁵- enkephalin changes independently during the development of kindling in rat. *Neurosci. Lett* 26: 125-130, (1981).
133. Vindrola O., Asai M., Zubieta M., Talavera E., Rodríguez E. and Linares G. Pentylentetrazol kindling produces a long-lasting elevation of IR-Met-enkephalin but not IR-Leu-enkephalin in rat brain. *Brain Res.* 297:121-125 (1985).
134. Wasterlain CG, Farber DB. A lasting change in protein phosphorylation associated with septal kindling. *Brain Res.* 247:191-194 (1982).
135. Wasterlain CG., Farber DB. Kindling alters the calcium/calmodulin dependent phosphorylation of synaptic plasma membrane proteins in rat

- hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. :USA 81: 1253-1257 (1984)*.
136. Weinstein H., Mehler EL. Ca^{2+} -binding and structural dynamics in the functions of calmodulin. *Annu. Rev. Physiol. 56:213-236, (1994)*.
137. White G. and Raynor S. The effects of trifluoperazine, an inhibitor of calmodulin on platelet function. *Trombosis Res. 18:279-284 (1980)*.
138. Wong P.Y.K. and Cheung W.Y. Calmodulin stimulates human platelet phospholipase A2. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 90:473-480 (1979)*.
139. Wu K., Wasterlain C. Sachs L, Siekevitz P. Effect of septal kindling on glutamate binding and calcium/calmodulin dependent phosphorylation in a postsynaptic density fraction isolated from rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.:USA 87: 5298-5302 (1990)*.
140. Yoshikawa K., Hong JS., Sabol S. Electroconvulsive shock increases preproenkephalin messenger mRNA abundance in rat hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci.:USA 82: 589-593, (1985)*.
141. Zhou LW., Moyer JA., Muth EA., Clark B. Palkovitz MB. Regional distribution of calmodulin activity in rat brain. *J. Neurochem. 44:1657-1666 (1985)*.
142. Zhu PC., Thurens-Klein A., Klein RL. Exocytosis from large dense cored vesicles outside the active synaptic zones of terminals within the trigeminal

subnucleus caudalis: a possible mechanism for neuropeptide release.

Neuroscience 19: 43-54, (1986).

43. Zhu X., Lindberg I. 7B2 facilitates the maturation of proPC2 in neuroendocrine cells and is required for the expression of enzymatic activity. *J. Cell. Biol.* 129: 1641-1650 (1995).

44. Zubieta M., Vindrola O., Talavera E., Asai M., Massarini A., Linares G. Pentylentetrazol-induced seizures produce an increased release of IR-Met-Enkephalin from rat striatum in vitro. *Brain Res.* 360:101-107, (1985).

GLOSARIO

- CaM-KII: calmodulina cinasa II
CAM: calmodulina
EGTA: ácido etilen-bis(oxietilen-nitril)-tetraacético
GABA: ácido gama aminobutírico.
HPLC: cromatografía líquido de alta presión
IR: inmunoreactividad
KPTZ: kindling con pentilenetetrazol
 μ M: micromolar
PA: proencefalina A
PBS: solución amortiguadora de fosfatos
PC1: proteína convertasa 1
PC2: proteína convertasa 2
PD: prodinorfina
PKC: proteína cinasa C
PMA: agonista de la enzima proteína cinasa C
Pmol: picomol
PTZ: Pentilenetetrazol
SNC: Sistema Nervioso Central
TFA: ácido trifluoroacético
TFP: trifluoroperazina
W7: naftalensulfonamida-7