

7/04/2010 N°1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO METODOLÓGICO, OPTIMIZACIÓN Y APLICACIONES DE LA TÉCNICA DE PERFUSIÓN INTRACEREBRAL EN ANIMALES EN LIBRE MOVIMIENTO; ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN IN VIVO DE PROTEÍNAS Y PEPTIDOS OPIOIDES EN ÁREAS ESPECÍFICAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESPECIALIDAD BIOQUÍMICA

P R E S E N T A

BENITO ANTON PALMA

México, D. F.

1988



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.

FACULTAD DE QUIMICA  
DIRECCION

Licenciada Susana Montañó Casimiro.  
Jefe de la Unidad de Registro e Información.  
Ciudad Universitaria.  
Presente.

Me es muy grato informar a usted que el alumno Benito Antón Palma, presentará próximamente su examen para obtener el - grado de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica) ante el siguiente jurado.

Presidente	Dr. Jorge Vázquez
1er. vocal.	Dr. Carlos Aránburu
Secretario	Dr. Miguel Luján
Suplente	M. en C. Ana María López C.
Suplente	Dr. Alejandro Bayón

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Ciudad Universitaria D.F. 10 de octubre de 1987.

El Director

Doctor Francisco Barnés de Castro

c.c.p. Coordinador de Area  
c.c.p. Coordinación Escolar  
c.c.p. Integrantes del jurado  
c.c.p. Interesado

RJBC/im.

## A G R A D E C I M I E N T O S

AGRADEZCO LA ORIENTACION Y EL APOYO PROPORCIONADOS POR MI TUTOR, DR. ALEJANDRO BAYON CASO, EN EL DESARROLLO DEL - PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACION.

EXTIENDO MI AGRADECIMIENTO A LA M. EN C. SARA SOLANO Y AL MEDICO CIRUJANO PHILIPPE LEFF, POR SU DESINTERESADA -- COLABORACION.

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACION SE DESARROLLO EN LOS SIGUIENTES LUGARES:

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN FISILOGIA CELULAR (CIFICE, AHORA INSTITUTO), DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS, UNAM.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS (IIBM), DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR, UNAM.

INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRIA (IMP), LABORATORIO DE NEUROQUIMICA, DIVISION DE INVESTIGACIONES CLINICAS.

A LAS DEPENDENCIAS ANTES MENCIONADAS HAGO PATENTE MI RECONOCIMIENTO.

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A TODOS MIS SERES QUERIDOS,

POR SU APOYO Y COMPRENSION

## INDICE GENERAL

	Página
INDICE DE FIGURAS .....	i
INDICE DE TABLAS.....	ii
INDICE DE ABREVIATURAS.....	iii
SUMMARY .....	iv
I. INTRODUCCION Y RESUMEN.....	1
II.GENERALIDADES Y ANTECEDENTES	
A) La neuroquímica <u>in vivo</u> .....	5
B) El ácido gama-aminobutírico (GABA), como modelo de neurotransmisor clásico.....	19
C) Los péptidos opioides, encefalinas, como un modelo de estudio de mensajeros peptídicos .....	39
D) Las proteínas (y enzimas) como posibles agentes mensajeros químicos en el sistema nervioso .....	64
III.PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES .....	85
IV. RESULTADOS: PUBLICACIONES I, II y III.....	87
1) Bayón, A., Solano, S., Antón, B., Castaño, I., and Díaz-Pontones, D. (1985). Push-Pull Perfusion Studies on the In Vivo Release of Proteins, Enzymes, and the Neuroactive -- Peptides-Enkephalins from the Rat Brain. In: In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds), Academic Press, pp. 69-93 .....	90

II).	Bayón, A., Antón, B., Leff, P., and Solano, S. (1986). Release of Proteins, Enzymes, and the Neuroactive Peptides, Enkephalins, from the Striatum of the Freely Moving Rat. Ann. N.Y. Acad. Sci. 473: 401-417. ....	91
III).	Bayón, A., Antón, B. (1986). Diurnal Rhythm of the In Vivo Release of Enkephalin from the Globus Pallidus of the Rat. Regulatory Peptides 15: 63-70 .....	92
V).	DISCUSION CONJUNTA .....	93
VI).	BIBLIOGRAFIA .....	121



## INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.- Modelo de Cánula Gaddum-Myers
- FIGURA 2.- Formas alternativas de implantación de la cánula de perfusión intracerebral de infusión-extracción (Push-Pull) de líquido.
- FIGURA 3.- Esquematzación del procedimiento de bombeo de líquido que utiliza el sistema de jeringas reciprocantes para la infusión y extracción de líquido.
- FIGURA 4.- Esquematzación del procedimiento de bombeo de líquido que utiliza bombas polistálticas pulsátiles para la infusión y extracción de líquido.
- FIGURA 5.- Modelos de Cánulas de perfusión.
- FIGURA 6.- Representación gráfica de los sistemas neuronales de proyección GABAérgicos propuestos en el cerebro de mamíferos.
- FIGURA 7.- Representación esquemática de las estructuras protéicas precursoras de las tres familias de péptidos opioides.
- FIGURA 8.- Representación gráfica de los principales sistemas neuronales conformados por somas y fibras nerviosas inmunorreactivas a encefalinas.
- NOTA: Este índice no incluye a las figuras de los trabajos experimentales que conforman la sección de Resultados de la presente tesis.

## INDICE DE TABLAS

TABLA I.- Distribución regional del GABA en el encéfalo del mono (rhesus).

TABLA II.- Proyecciones neuronales GABAérgicas propuestas en el cerebro de mamíferos: resumen de evidencias experimentales que apoyan su existencia.

TABLA III.- Precusores y miembros peptídicos de la Familia de los Péptidos Opioides: estructura y clasificación.

TABLA IV.- Distribución de encefalinas en el sistema nervioso central de la rata.

NOTA: Este índice no incluye a las tablas de los trabajos experimentales que conforman la sección de Resultados de la presente tesis.

## INDICE DE ABREVIATURAS

AChE.-	Acetilcolinesterasa
ACTH.-	Hormona adrenocorticotrofa
ADN.-	Acido desoxirribonucléico
ADNc.-	Acido desoxirribonucléico complementario
ARNm.-	Acido ribonucléico mensajero
$\alpha$ -MSH.-	Hormona alfa-estimulante de los melanocitos
BSA._	Albúmina bovina de suero
$\beta$ -END.-	Beta-endorfina
$\beta$ -LPH.-	Beta-lipotropina
$\beta$ -MSH.-	Hormona beta-estimulante de los melanocitos
$^{45}\text{Ca}^{++}$ .-	Radioisótopo del calcio
ChE.-	Colinesterasa no específica
CLIP._	Péptido del lóbulo intermedio similar a corticotrofina
DBH.-	Dopamina beta-hidroxilasa
EGTA.-	Etilenglicol-bis(beta-aminoetiléter)N,N'-ácido tetraacético.
ENK.-	Encefalina

GABA.- Acido gama-aminobutírico

GABA-H<sup>3</sup>.-Acido gama-aminobutírico tritiado

GABA-T.- Transaminasa del ácido gama-aminobutírico

GAD.- Descarboxilasa del ácido glutámico

GP.- Globus pallidus

γ-MSH.- Hormona gama-estimulante de los melanocitos

IP.- Intraperitoneal

LCR.- Líquido cefalorraquídeo

(Leu)encefalina.- Leucina encefalina

LDH.- Deshidrogenasa láctica

(Met)encefalina.- Metionina encefalina

MOR.- Movimientos oculares rápidos

MPE.- Material protéico endógeno

NC.- Nucleo caudado

NILE.- Proteína externa inducida por el factor de crecimiento nervioso.

6-OHDA.- 6-hidroxidopamina

POMC.- Proopiomelanocortina

RIA.- Radioinmunoensayo

S.E.M.- Error estandar de la media

SN.- Sustancia nigra

SNC.- Sistema nervioso central

SSDH.- Deshidrogenasa del semialdehído succínico

TCA.- Acido tricloroacético

TLC.- Cromatografía en placa fina

TRH.- Hormona liberadora de tirotrófina

TTX.- Tetrodotoxina

## SUMMARY

"Methodological development, optimization and applications of the push-pull perfusion technique in the freely moving animals: Study of the in vivo release of proteins and opioid peptides from specific areas of the central nervous system".

In order to study the physiological regulation of neurochemical events and their integration into the neural function, an in vivo approach is needed. These studies are possible through the in vivo perfusion of deep brain nuclei, a technique that requires reliable probes and pressure buffering systems to introduce a stream of physiological fluid into the brain, allowing the administration and sampling of chemicals into and from defined neural structures. Some of the basic technical problems and limitations of the in vivo perfusion which must be controlled are the lesion of the tissue produced by the perfusing device, by hydrodynamic accidents, or by the constant circulation of fluid through the tissue; the decrease of the neural responsiveness of the tissue to stimulation along perfusion; and the efficiency of the diffusional exchange between the tissue and the perfusion medium. The initial part of this thesis deals with the use of biochemical markers (proteins, peptides, and nonpeptides transmitters) to assess tissue damage and viability along perfusion. In this context, we describe the functional advantages that offers the use of a novel design on the geometry of the concentric push-pull cannula (Gaddum-Myers, the probe most widely used for in vivo perfusion). Our results show that, compared to the classical Gaddum cannula, this design (slotted-tip cannula) produces less tissue damage during perfusion, and keeps tissue-medium exchange similar to that observed with the classical model. Additionally, we present data on the in vivo release of protein material and several enzyme activities from the striatum, this release being induced by mechanical means or by chemical depolarization. We also give evidence of the in vivo release of the neuropeptides enkephalins, presenting results on the physiological regulation of this release, which show diurnal in vivo fluctuations in the globus pallidus of the freely moving rat.

I

INTRODUCCION Y RESUMEN

I I

GENERALIDADES Y ANTECEDENTES



El concepto de que la comunicación neuronal es mediada químicamente ha sido uno de los pilares fundamentales que nos ha permitido entender el código químico de las funciones cerebrales. Es de aceptación general que la demostración de la liberación de una sustancia es un criterio importante para catalogarla como agente neurotransmisor. En este contexto, las técnicas neuroquímicas de análisis in vitro han brindado un avance sustancial en el estudio de los eventos neuroquímicos de la transmisión nerviosa. Así, la experimentación en regiones cerebrales aisladas y estructuras celulares y subcelulares, mecánicamente fraccionadas, ha facilitado el control de las condiciones experimentales en las cuales son estudiadas. Sin embargo, su aislamiento tiene como consecuencia la pérdida de su conectividad nerviosa con el resto del cerebro y del organismo entero. Por lo tanto, se han desarrollado enfoques experimentales in vivo, en donde ha sido posible estudiar la regulación fisiológica de los eventos neuroquímicos y, su integración en la función cerebral del animal vivo.

En este sentido, la técnica de perfusión intracerebral push-pull (infusión y extracción de líquido) ha demostrado ser una herramienta útil en el estudio de la liberación in vivo de agentes neuroactivos en el sistema nervioso de animales en libertad de movimiento y conductualmente activos. Este procedimiento permite llevar a cabo estudios en regiones cerebrales específicas, en las cuales se preserva la integridad de sus conexiones neurales con el resto del sistema nervioso y, permite también, correlacionar eventos neuroquímicos y conductuales. Adicionalmente, al facilitar la introducción continua de líquido fisiológico artificial y su extracción y recolección inmediatas del sitio de perfusión mediante dos tubos dispuestos concéntricamente y acoplados a un sistema de bombeo, permite la administración y recolección de sustancias químicas en el tejido perfundido.

Sin embargo, la incidencia de fracasos experimentales con el uso de

esta técnica es alta, los que son debidos fundamentalmente, a la presencia de fragmentos de tejido y/o coágulos sanguíneos que obliteran la parte terminal del tubo de extracción de la cánula. Estos materiales son producidos por el desarrollo de presiones negativas en el sitio de perfusión y por el efecto erosivo, que sobre el tejido, causa la circulación directa del líquido de perfusión. Las cánulas concéntricas de uso común (Gaddum-Myers) tienen la tubería interior (infusión) protruyendo del cuerpo de la exterior (extracción) y en contacto directo con el tejido. El traumatismo que produce la circulación del líquido en los sitios de perfusión origina daño mecánico al tejido y, eventualmente, obstrucción en el flujo del líquido, lo que altera la viabilidad de la preparación y enmascara las observaciones experimentales.

Con el objeto de minimizar estos inconvenientes y limitaciones, se diseñó y puso a prueba una modificación de la geometría de la punta de la cánula de uso tradicional. En nuestro modelo (de punta ranurada) hemos evitado la protrusión de la tubería interna del cuerpo de la externa, con el objeto de proteger al tejido de los efectos mecánicos directos ocasionados por la circulación del líquido infundido. Para comparar el funcionamiento de los dos diseños de cánulas, y con el propósito de registrar el daño y viabilidad del tejido perfundido, hemos utilizado indicadores físicos de lesión (sangrado y recuperación disminuida de líquido de perfusión). Con el mismo objetivo, hemos empleado marcadores bioquímicos de lesión (proteína endógena total, actividades enzimáticas de lactato deshidrogenasa, colinesterasa y proteasa), de eficiencia en la difusión tejido-medio de perfusión (difusión de proteína endógena hacia el líquido de perfusión), medio de perfusión-tejido (índice de captura tisular de GABA-H<sup>3</sup>) y de viabilidad del tejido durante la perfusión (capacidad de liberación basal y estimulada de neurotransmisores representativos peptídicos (encefalina) y no peptídicos (GABA))

Los resultados muestran que el uso de nuestro diseño reduce la frecuencia de obstrucciones en el flujo del líquido, así como de lesiones accidentales, manteniendo una eficiencia de perfusión y recolec-

ción y una viabilidad comparables a las obtenidas con el uso de la cánula tradicional.

Más recientemente se ha modificado también el sistema de extracción (normalmente aislado de la presión atmosférica), permitiendo la entrada de aire en el mismo, con el fin de evitar el desarrollo de presiones negativas y lesión consecuente del tejido perfundido.

Nuestros resultados muestran que el uso combinado en la perfusión de nuestro modelo de cánula de punta ranurada y el sistema de extracción abierto ha mostrado ser eficaz en la detección con alta resolución de la liberación in vivo de neurotransmisores (GABA-H<sup>3</sup>) y proteína endógena (función aún no caracterizada) evocada por distintos procedimientos.

La confiabilidad, reproducibilidad, resolución temporal y sensibilidad que ahora provee esta técnica, nos ha permitido extender su uso al estudio de los mecanismos y la regulación de la liberación in vivo en forma fisiológica, de sustancias neuroactivas en estructuras neurales definidas en el animal consciente y en libertad de movimiento (correlación neuroquímica-conducta).

El globus pallidus es una región neural idónea para el estudio de la liberación de transmisores peptídicos (encefalina) (presenta la más alta concentración de encefalina y de terminales nerviosas encefalinérgicas en el sistema nervioso) y no peptídicos (GABA) (exhibe uno de los más altos contenidos de la glutamato descarboxilasa que sintetiza a este aminoácido en las terminales sinápticas). Basados en evidencias experimentales que han sugerido la existencia de un mecanismo de regulación tónica inhibitoria, dependiente del GABA, sobre la liberación de encefalinas en esta región, decidimos estudiar de forma comparada su liberación in vivo en el globus pallidus de la rata en libertad de movimiento.

Nuestros resultados son consistentes con el mecanismo propuesto y muestran que la liberación de estos mensajeros está en correlación

inversa, y sigue un patrón circádico. Además, estas observaciones, junto con otras evidencias farmacológicas, sugieren que estos ritmos bioquímicos están ligados con los ritmos de actividad motora de la rata.

## A). LA NEUROQUIMICA IN VIVO .

### 1.- INTRODUCCION

El avance científico se ha encontrado estrechamente vinculado al desarrollo de métodos y estrategias experimentales que nos han permitido observar, analizar y cuantificar los fenómenos naturales. Desde el inicio del presente siglo, la comprensión del funcionamiento del sistema nervioso de los mamíferos ha sido, sin lugar a dudas, una de las interrogantes que más ha atraído la atención del neurocientífico. Sus esfuerzos lo han llevado al descubrimiento de la unidad anatómo-funcional que lo conforma, la neurona, y por lo tanto, a la idea de que la comprensión de los mecanismos que permiten la comunicación entre las neuronas sentarían las bases para explicar el funcionamiento del conjunto (el sistema nervioso).

Hacia 1906, Sherrington denomina sinapsis al sustrato anatómico, exclusivo de las células nerviosas, que permite su comunicación. Paralelamente, Bois, Raymond, Elliot, Loewi y Dale establecen los principios de la teoría química de la comunicación interneuronal. Se establece así, que la transmisión nerviosa se inicia con la llegada del impulso nervioso (señal eléctrica) a la terminal sináptica, la cual induce la liberación de un "mediador químico" (agente neurohumoral) al espacio intersináptico, que al interactuar con la membrana de la célula postsináptica, genera en ésta una señal eléctrica. En la actualidad, denominamos a estos mediadores químicos neurotransmisores.

A pesar de la enorme complejidad del sistema nervioso, se tiene la convicción de que la transmisión del impulso nervioso de una neurona a otra representa un evento fundamental en la función neural, lo que ha propiciado el desarrollo de uno de los enfoques más exitosos desde el punto de vista experimental en la neurociencia actual: el estudio del funcionamiento del sistema nervioso a través de la comprensión del papel fisiológico que desempeñan los neurotransmisores. Por esto, se ha centrado la atención dentro de la neuroquímica actual en el estudio de las correlaciones entre la bioquímica regional del cerebro y la expresión de estados conductuales en el animal.

Esto ha hecho posible la formulación del concepto de la " codificación neurohumoral de las funciones cerebrales " (Myers y Drucker-Collín, 1974). Dentro de este contexto, se han desarrollado alternativas metodológicas y estrategias experimentales que han facilitado el estudio de la regulación fisiológica de los eventos neuroquímicos implicados en la transmisión sináptica en estructuras neurales definidas y su integración en el funcionamiento nervioso y conductual en el animal vivo( preservando la conectividad nerviosa normal de aquellas con el resto del cerebro). Así, este enfoque alternativo ha representado un avance sustancial en la neurociencia actual: el estudio de la neuroquímica in vivo .

## 2.- ALTERNATIVAS METODOLOGICAS EN EL ESTUDIO DE LA NEUROQUIMICA IN VIVO

Hacia el final de la década de los 50's, Fox y Hilton (1958) diseñaron un sistema de tubos paralelos para perfundir tejido subcutáneo. Posteriormente, Gaddum(1961) y luego Myers (Myers, 1970; Myers y Beleslin, 1970; Myers, 1972 ) adaptaron un sistema de tubos de infusión y extracción, ensamblados concéntricamente (" para localizar el sitio de liberación de sustancias en tejidos tales como el del sistema nervioso central en forma más precisa que por otros procedimientos", en palabras de Gaddum) que revolucionó el estudio de la neuroquímica in vivo (Fig.1).

Para entender la importancia y repercusiones que este desarrollo metodológico representa en la neurobiología actual, es necesario comprender su principio funcional y las ventajas experimentales que el mismo ofrece: infusión controlada y extracción simultánea de líquido fisiológico artificial a través del tejido nervioso, que permite la formación de una superficie de contacto y difusión bidireccional entre el líquido administrado exógenamente y los elementos tisulares del área perfundida. Con esto, es posible administrar agentes neuroactivos (neurotransmisores exógenos, fármacos, etc.) disueltos en el líquido de infusión y, también, coleccionar fraccionadamente y analizar el líquido extraído del cerebro del animal vivo (Bayón y

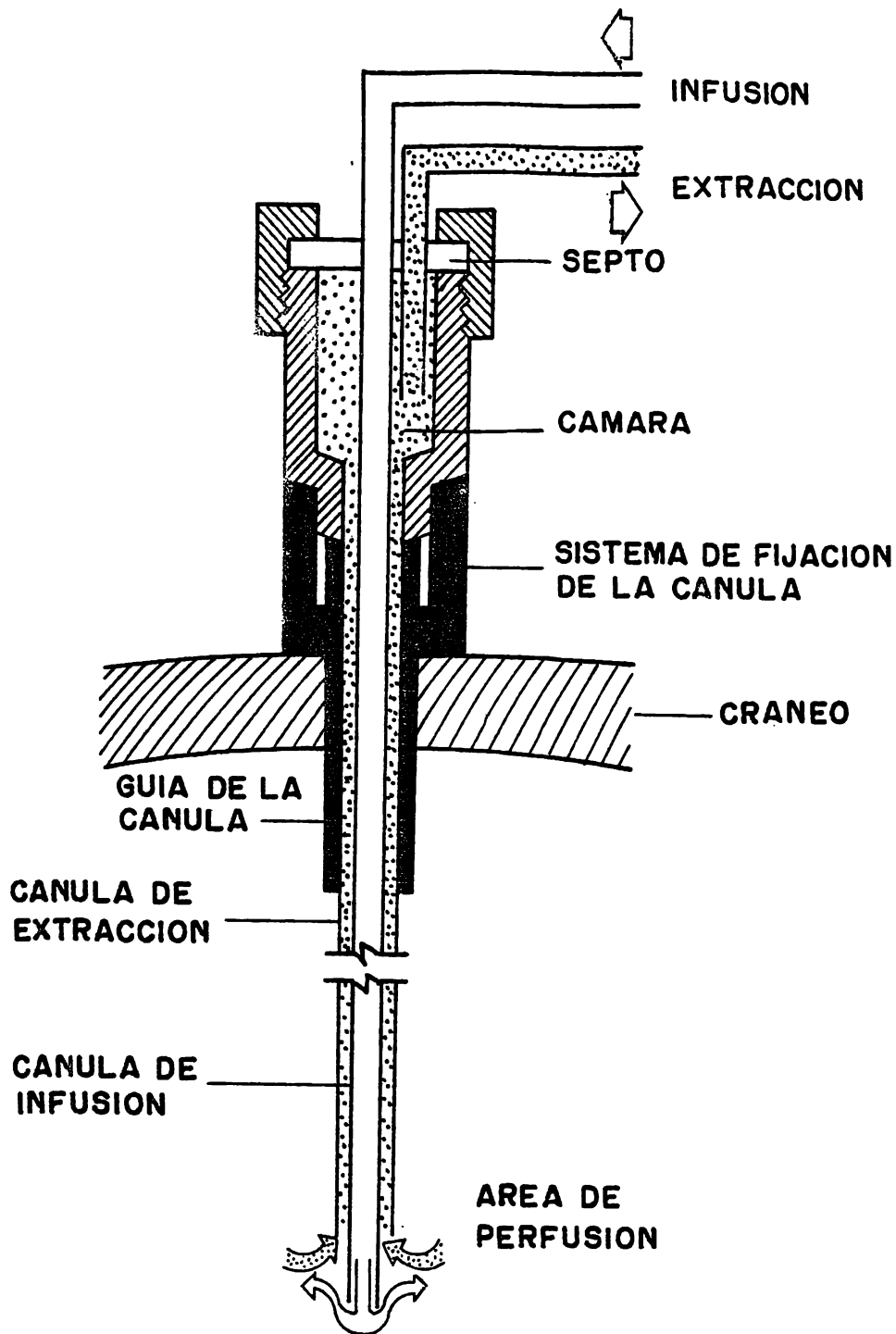


Fig. 1. Modelo de Cánula Gaddum-Myers. El sistema de tubos de entrada (en blanco) y de salida (en punteado) del líquido es concéntrico a los largo de la punta de la cánula y se separan después de entrar a la cámara superior, la cual se encuentra conformada por dos piezas de acero inoxidable atornilladas entre sí (en rayado) y un septo de hule (en blanco). La cánula-guía presenta una grapa de fijación para la cánula de perfusión (en negro). Nótese que la cánula de perfusión tiene en su extremo terminal (en contacto con el tejido) la tubería interior (infusión) protruyendo del cuerpo de la exterior (extracción).

Drucker-Colín, 1985; Bayón, 1987).

Paralelamente, se han desarrollado procedimientos técnicos de perfusión análogos al implementado por Gaddum-Myers y , aún con los refinamientos que cada uno de ellos ha incorporado, todos exhiben el mismo principio funcional anteriormente expuesto. Los más representativos, se basan en el uso de copas de superficie ( básicamente corticales ), tubos de infusión-extracción ventriculares y, membranas de diálisis.

Las copas corticales son cámaras de perfusión ( con tubos para infundir o extraer líquido a través de ellas) adheridas en forma aguda ( Da Silva y Sproull, 1964; Celesia y Jasper, 1966) o crónicamente ( Beleslin y Myers, 1970 ) a la superficie del cerebro. Beleslin (1965) y Jasper (1969) las han utilizado en el estudio de la liberación de acetilcolina de la superficie de la corteza motora.

Las cánulas ventriculares son un dispositivo de dos tubos implantados en regiones separadas del sistema ventricular cerebral, las cuales permiten la infusión y extracción del líquido cefalorraquídeo en la cavidad presente entre ambos. Su descripción inicial fué hecha por Leusen (1948), Bhattacharya y Feldberg (1958), Pappenheimer y colaboradores (1962) y MacIntosh y Oborin (1963). Adicionalmente, diversos autores la han empleado para estudiar la liberación de acetilcolina (Bhattacharya y Feldberg, 1958 a,b), serotonina (Feldberg y Myers, 1966) y norepinefrina ( Carr y Moore, 1969) hacia el lumen ventricular.

La técnica de perfusión que usa membranas de diálisis, descrita originalmente por Delgado (1970), consiste en un sistema de tubos de infusión y extracción de líquido, ensamblados concéntricamente en forma análoga al sistema Gaddum-Myers. Su porción terminal se encuentra cerrada por una membrana porosa permeable, selectiva al paso de sustancias de bajo peso molecular. Actualmente, se han desarrollado modelos alternativos, en función de las necesidades de cada autor; sin embargo, todos se basan en el mismo principio funcional inherente al diseñado originalmente por Delgado (Kovacs, 1976;



Zetterström y Col. 1982; Ungerstedt, 1982; Hamberger y Col. 1985).

A pesar de las posibilidades y ventajas experimentales que han brindado estas herramientas de perfusión en el estudio de la neuroquímica in vivo, la utilización en paralelo del modelo Gaddum-Myers ha demostrado, en ellas, sus principales inconvenientes: el uso de las copas corticales y de las cánulas ventriculares se encuentra restringido a las superficies o cavidades cerebrales, respectivamente. Desde este punto de vista, son inadecuadas en el estudio de la bioquímica de regiones discretas, situadas en el interior del parénquima nervioso. Por el contrario, la técnica de diálisis, a pesar de ofrecer la ventaja experimental en el estudio de áreas discretas y multiplicidad regional en el tejido nervioso, presenta el inconveniente en la existencia de la membrana de permeación, a través de la cual el intercambio de líquido y sustancias químicas entre el medio infundido y el tejido, o viceversa, es lento y de baja eficiencia. En este sentido, su uso experimental es generalmente inadecuado en el estudio de la liberación de agentes neuroactivos poco abundantes o que se degradan rápidamente o que no permean por su tamaño molecular a través de la membrana de diálisis (ejem: neuropeptidos y proteínas).

Ya que los principios básicos de funcionamiento de las herramientas de perfusión anteriormente expuestas son muy similares al sistema concéntrico de cánulas Gaddum-Myers, parece justificado usar éste modelo en la discusión de los principales problemas metodológicos y limitaciones experimentales inherentes a la perfusión in vivo.

### 3.- FACTORES QUE INFLUENCIAN LA EFICIENCIA DE LA TECNICA DE PERFUSION IN VIVO DE INFUSION-EXTRACCION DE LIQUIDO

Los métodos y sistemas de perfusión de infusión-extracción de líquido se sitúan dentro del campo experimental en donde el sujeto bajo estudio es afectado por los instrumentos experimentales. A pesar del uso relativamente extenso que han tenido en la exploración y experimentación de la neuroquímica in vivo (ver Bayón y Drucker-Colín, 1985), es solo a partir de la década de los 70's que se ha

intentado la identificación y resolución de sus principales problemas técnicos. Así, el mayor de ellos ha radicado en la dificultad para mantener un flujo estable del medio de perfusión en interfase con el área de tejido perfundida ( se produce daño tisular a consecuencia de cambios extremos de presión que condiciona la obstrucción en la circulación del líquido) ( Myers, 1972; Bayón y Drucker-Colín, 1985; Redgrave, 1985).

Existen dos causas importantes que pueden dar origen a alteraciones en la circulación del líquido de perfusión en el área de perfusión. La más frecuente se debe a la presencia de " obstrucciones" de origen sanguíneo ( coágulo de sangre y/o plasma ), a causa de la ruptura de los elementos vasculares que irrigan la región, ya sea por el trauma mecánico inducido sobre el tejido por la introducción aguda o movimientos de la cánula y/o por cambios de presión hidrostática en el sitio de perfusión. La segunda y menos frecuente, se debe a la entrada de fragmentos de tejido en el sistema canular de extracción y, es debida principalmente, a la eventual destrucción del tejido por el trauma mecánico.

Así, la acumulación en mayor o menor cuantía del líquido de perfusión en el cerebro ( dependiendo de la magnitud y duración de la obstrucción ), será un común denominador que en muchas ocasiones llevará al fracaso del experimento ( el excesivo daño tisular en el área de perfusión generalmente redundará en un decremento de la respuesta tisular a la estimulación o manipulación farmacológica). Por ello, se han desarrollado y usado procedimientos tendientes a minimizar esta clase de problemas. La implantación crónica de la cánula (usualmente 4-5 días antes de llevar a cabo la perfusión )(Fig.2) evita el sangrado excesivo observado a veces en la perfusión tras una inserción aguda. Sin embargo, su principal desventaja radica en que la presencia crónica de la cánula en el tejido produce gliosis en el área de perfusión, la cual puede tener efectos adversos en el estudio de la liberación de agentes neuroactivos( ejemp. encefalinas; Bayón y Col. 1981 a,b). Por el contrario, otros autores han mostrado que el procedimiento no da origen siempre a este efecto(ejem.

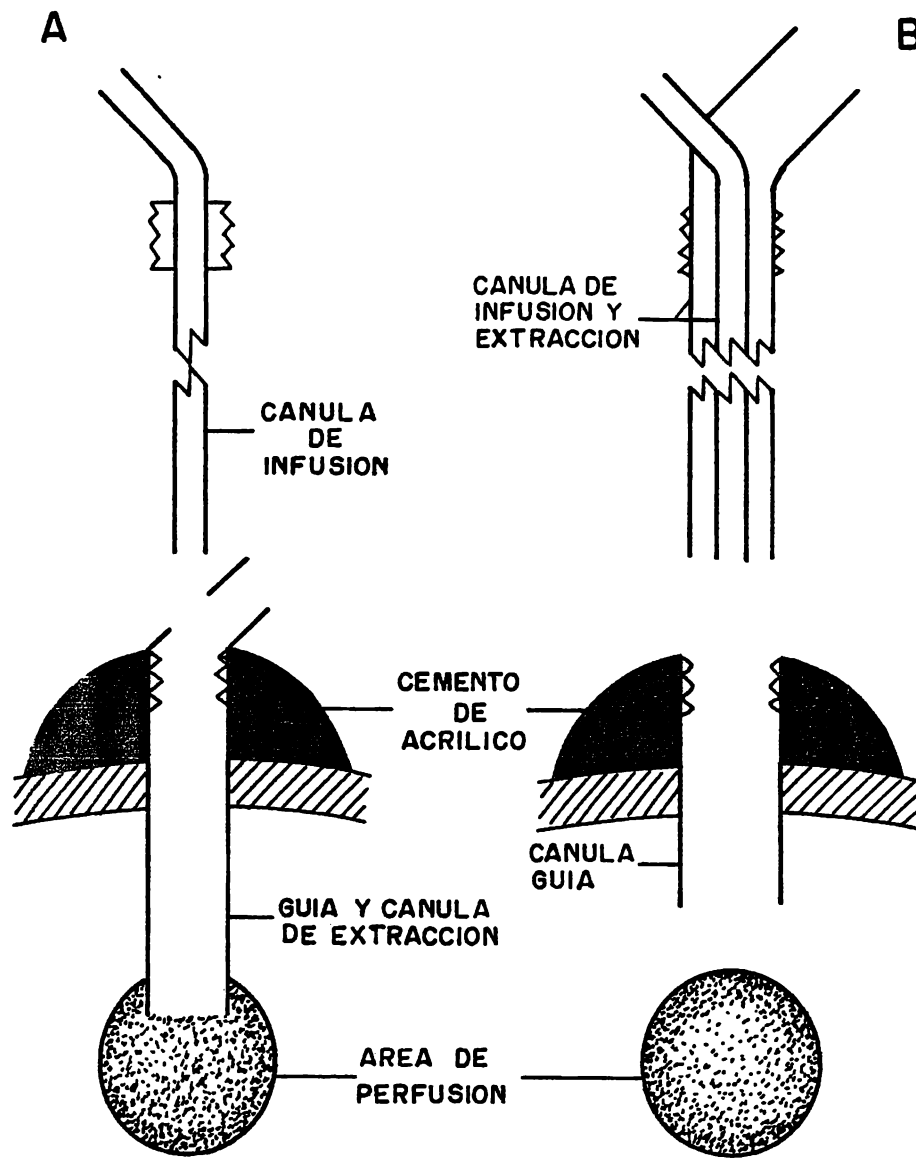


Fig. 2. Formas alternativas de implantación de la cánula de perfusión de infusión-extracción. A) El tubo de extracción funciona como cánula-guía y se implanta en forma permanente en el sitio de perfusión. El tubo de infusión se inserta sobre la cánula-guía de extracción en el momento de la perfusión. B) La cánula de infusión-extracción se inserta sobre la cánula-guía hasta el sitio de perfusión en el momento de la perfusión. La cánula-guía ha sido implantada previamente (usualmente una semana - antes del experimento) varios mm por arriba del sitio de perfusión.

liberación del factor liberador de la hormona luteotrófica; Ramirez, 1985). En vista de esto, la elección del procedimiento dependerá de la estrategia y sujeto particulares de estudio de cada investigador-

En ocasiones, para evitar el sangrado, es posible cambiar la ruta estereotáxica de implantación de la cánula, eligiendo una trayectoria diferente para tratar de evitar la lesión de vasos sanguíneos importantes ( siempre hay ruptura de vasos pequeños, pero el sangrado que por esto se produce es de poca importancia y tiende a ceder en unos cuantos minutos). En relación con esto, otra estrategia adecuada se basa en el aumento de la velocidad del flujo del líquido de perfusión o la reducción de la concentración de calcio del medio de perfusión (Ramirez, 1985), medidas tendientes a lograr una remoción rápida de la sangre y disminuir su capacidad de coagulación, reduciendo en esta forma, la probabilidad de formación de un coágulo en el sitio de perfusión.

Por otro lado, la obstrucción en el flujo del líquido por fragmentos de tejido puede ser consecuencia inmediata del trauma mecánico inducido durante la inserción aguda de la cánula. Los esfuerzos por minimizar este problema han favorecido la utilización de una "cánula falsa" (mandril), que se inserta y extrae hasta el sitio de perfusión, antes de iniciar el experimento, para que al introducir la cánula de perfusión, ésta no se bloquee al rasgar el tejido.

Otro de los factores que son causa inmediata de lesión y oclusión, son los ocasionados por el movimiento de la cánula una vez que ha sido introducida dentro del cerebro del animal. En vista de esto, su inmovilización debe ser requisito indispensable cuando se quieren disminuir esos problemas. Esto, básicamente se ha logrado en dos formas: usando preparaciones agudas en donde el animal es anestesiado e inmovilizado durante la perfusión ( aunque con esto el efecto del anestésico sobre la preparación debe ser valorado; ver Cesselin y Col. 1981), o en animales en libertad de movimiento mediante el implante crónico en el cerebro de una cánula-guía adherida y sujeta al cráneo (ver sección de procedimientos quirúrgicos en el capítulo de metodología de esta tesis), en donde se inserta y fija

la cánula de perfusión (Fig. 1).

Aún en este último caso se deben tener cuidados adicionales, ya que movimientos bruscos y/o colisiones de la cabeza del animal con las paredes de la jaula o cámara de perfusión pueden producir una lesión del tejido del área perfundida (si tomamos en cuenta que el cerebro es un órgano que flota en el líquido cefalorraquídeo dentro de la cavidad craneal). Por lo tanto, es recomendable situar al animal bajo experimentación en un medio ambiente familiar, aislado de distracciones ambientales.

#### Cambios extremos de presión hidrostática

El desarrollo de cambios extremos de presión hidrostática en el área de perfusión es otro de los factores que inducen daño tisular y, muy frecuentemente, oclusión a la circulación del líquido (Redgrave, 1985). Por un lado, una presión positiva alta en el sistema de infusión lleva consigo la acumulación de líquido con desplazamiento y ruptura de los elementos tisulares en el área perfundida; por otro lado, la presión negativa en el sistema de extracción incrementa la erosión y lesión en el tejido y, eventualmente, con esto, origina obstrucción en el flujo del líquido de perfusión.

En la actualidad se dispone de dos procedimientos para bombear el líquido de perfusión. El primero (llamado sistema cerrado), se basa en el uso de mecanismos de alta precisión para la infusión y la extracción de líquido por medio de un sistema de bombeo recíprocante de jeringas, que mantienen un flujo constante a través del área cerebral perfundida (en esta forma el sistema permanece aislado de la presión atmosférica) (Fig. 3). Sin embargo, este tipo de sistema no posee óptima capacidad y eficiencia para equilibrar alteraciones de presión suscitadas por cambios en la resistencia del tejido en el área de perfusión (ejem. edema, oclusión, etc.), fenómeno, que como ya se ha dicho anteriormente, produce la acumulación de líquido y lesión tisular.

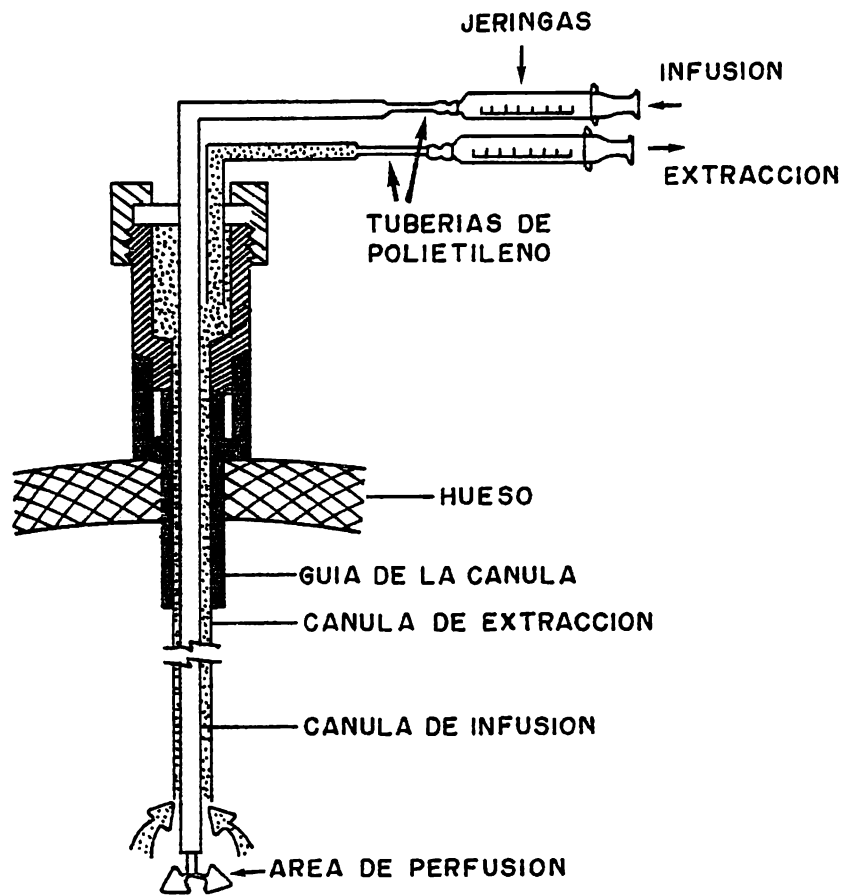


Fig. 3. Esquemmatización del procedimiento de bombeo de líquido que utiliza el sistema de jeringas reciprocantes. Las jeringas se encuentran conectadas a la cánula de infusión-extracción mediante tuberías de polietileno. Nótese que el sistema de extracción permanece aislado de la presión atmosférica.

Por el contrario, el segundo sistema (abierto), no requiere de mecanismos de infusión y extracción de alta precisión: se utilizan bombas polistálticas pulsátiles, que infunden y extraen líquido al presionar peristálticamente tuberías de Sylastic colocadas sobre rodillos que giran a la velocidad elegida. El balance de entrada y salida de líquido en el área de perfusión se logra mediante la apertura del sistema a presión atmosférica (Neouillón y Col. 1977) a través de una perforación en el tubo de extracción (Fig.4). En esta forma, los cambios de presión pueden ser equilibrados por la entrada de aire dentro del sistema de extracción cuando la resistencia del tejido varíe (se evita así el desarrollo de presión negativa en exceso en el sitio de perfusión).

Las cánulas concéntricas de uso común (modelo Gaddum-Myers) tienen la tubería interior (infusión) protruyendo del cuerpo del tubo exterior (extracción), lo cual, en gran medida, favorece el daño mecánico por la acción directa del flujo del líquido sobre el tejido, incrementando su erosión. Con el objeto de minimizar este inconveniente, se han diseñado y puesto a prueba modelos alternativos de cánulas, en donde básicamente se evita la protrusión del tubo de infusión con respecto al de extracción (se mantiene la tubería interna dentro del cuerpo de la externa) (Fig. 5). En esta forma el factor de erosión sobre el tejido es minimizado a expensas de la disminución del área de contacto entre el tejido y medio de perfusión (Iijima y Nunoki, 1985; Philippu, 1985).

Por esto último, la utilidad de cada modelo se valorará en función de su capacidad funcional para mantener la misma eficiencia de perfusión (difusión medio-tejido) y recolección (difusión tejido-medio) de agentes químicos comparables a la obtenida con el uso de la cánula tradicional (Gaddum-Myers) (ver resultados en la tesis).

#### 4.- LOGROS Y PERSPECTIVAS

El desarrollo alcanzado en el estudio del sistema nervioso en lo

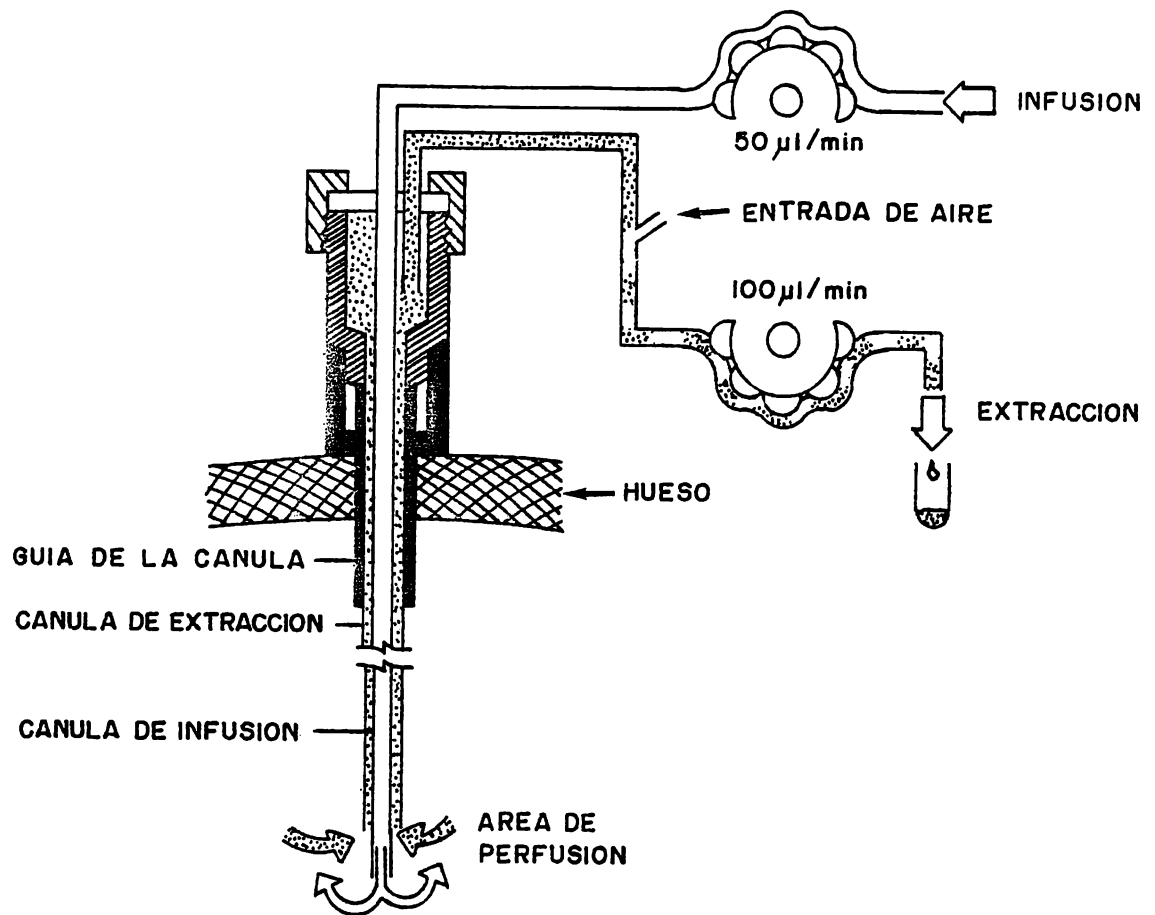


Fig. 4. Esquematzación del procedimiento de bombeo que utiliza bombas polistálticas pulsátiles para la infusión y extracción de líquido. La cánula de perfusión se encuentra acoplada al sistema de bombeo a través de tuberías de sylastic, colocadas sobre rodillos que giran a la velocidad elegida. El balance de entrada y salida de líquido en el área de perfusión se logra mediante la apertura del sistema de extracción a la presión atmosférica. La extracción se hace al doble de la velocidad de flujo de infusión, permitiendo así, la entrada de aire al sistema de salida del líquido.



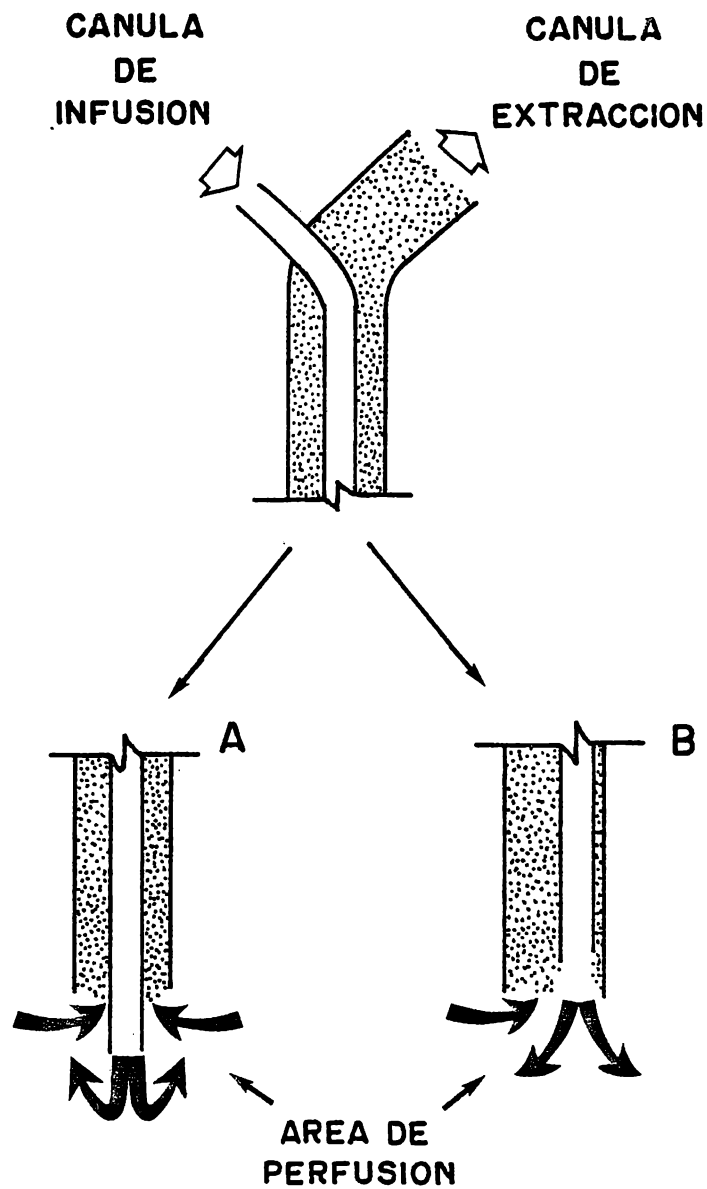


Fig. 5. Modelos de cánulas de perfusión. A). Modelo de cánula de uso tradicional (Gaddum-Myers). El sistema de tubos de infusión (en blanco) y de salida (en punteado) de líquido es concéntrico a los largo de la punta de la cánula. En su extremo terminal (en contacto con el tejido) la tubería interior (infusión) - protruye del cuerpo de la exterior (extracción). B) Diseño - alternativo al modelo de cánula Gaddum-Myers. El sistema de tubos de entrada y salida de líquido es excéntrico a los largo de la punta de la cánula. En el extremo terminal se mantiene la tubería interna dentro del cuerpo de la externa.

que va del presente siglo, ha permitido el análisis de la actividad neural desde el punto de vista interdisciplinario en la neurociencia actual.

El alto grado de complejidad funcional inherente al enfoque in vivo ha hecho necesario un estudio integral que ha favorecido el desarrollo y uso de métodos que permiten el análisis simultáneo de eventos neuroquímicos y conductuales en el animal de experimentación. Desde este punto de vista, las técnicas de perfusión cerebral in vivo han establecido las bases para este desarrollo. Su uso ha hecho posible el estudio de los mecanismos que controlan la liberación de agentes neuroactivos. De igual forma, han permitido el avance en el conocimiento de aspectos fundamentales de la modulación de esta liberación por fármacos y, en última instancia, a la elaboración de "mapas conceptuales" de la neuroquímica asociada a la actividad neural de regiones y circuitos nerviosos definidos (Bayón y Drucker-Colín, 1985; Chéramy y Col. 1985; Moore y Nielsen, 1985; Swartzwelder, 1985). Dentro de diagramas más complejos, se han establecido correlatos entre eventos fisiológicos y conductuales más elaborados en el funcionamiento neurovegetativo y neuroendócrino (Philippu, 1985; Ramirez, 1985; Ruwe, 1985) o en el control motor, aprendizaje, sueño y neuropatologías (Drucker-Colín, 1981; Martin y Haubrich, 1985; Redgrave, 1985; Velasco y Col. 1985).

Por otro lado, las técnicas de perfusión in vivo han también representado una herramienta metodológica de progreso para el aislamiento, identificación y caracterización de nuevos agentes neuroactivos a través de la implementación de técnicas cromatográficas (ejem. cromatografía líquida de alta presión) e inmunológicas (ejem. anticuerpos monoclonales) de gran resolución en el análisis de los perfusados.

B).- EL ACIDO GAMA-AMINOBUTIRICO ( GABA ), COMO UN MODELO DE NEURO-  
TRANSMISOR CLASICO

1.- 'INTRODUCCION

Uno de los mecanismos fundamentales en la regulación de la actividad neuronal es la inhibición debida a la hiperpolarización resultante de la interacción de neurotransmisores inhibidores con sitios específicos ( receptores). En el sistema nervioso central de mamíferos, así como en el de muchos invertebrados, ciertos aminoácidos como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la glicina se encuentran entre las moléculas responsables de esta función inhibitoria. La existencia del GABA en el cerebro se descubrió en el año de 1950 a partir de los estudios iniciales e independientes de Roberts y Awapara ( Roberts y Frankel, 1950; Awapara y Col. 1950).

El interés por este aminoácido en el tejido nervioso se originó por el hecho de que en vertebrados se encuentra en altas concentraciones exclusivamente en este tejido, y solo cantidades muy pequeñas han podido demostrarse en otros órganos ( Curtis, 1975). Gran parte de la información sobre la acción inhibitoria de este neurotransmisor pudo ser obtenida en sitios sinápticos relativamente accesibles, donde fue posible observar su liberación consecuente a la estimulación nerviosa (sinapsis de la neurona sensorial del tensoreceptor del acocil, Células de Purkinje del cerebelo de mamíferos y unión neuromuscular de la langosta) (Curtis y Johnston, 1974; Curtis, 1975). En la actualidad, diversos estudios han establecido su papel como el neurotransmisor inhibitorio más ampliamente distribuido en el sistema nervioso central de mamíferos, así como de otros vertebrados, y en el sistema nervioso periférico de algunos invertebrados ( Curtis, 1975; Roberts y Col. 1976; Tapia, 1983 ).

2.- METABOLISMO DEL GABA EN EL SISTEMA NERVIOSO: BIOSINTESIS Y  
DEGRADACION ( INACTIVACION )

La síntesis del GABA en el sistema nervioso de vertebrados e inver--

tebrados se realiza a partir de la  $\alpha$ -descarboxilación del ácido glutámico. La reacción, que es catalizada por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), tiene como productos al GABA y bióxido de carbono. Por otro lado, la vía catabólica más importante es la transaminación reversible con el ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, mediada por la actividad de la transaminasa del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA-T), dando como productos ácido glutámico y semialdehído succínico por la acción de la deshidrogenasa del semialdehído succínico (DHSS).

Es de particular importancia señalar, en cuanto al significado funcional del metabolismo del GABA, que su síntesis y catabolismo se realizan en regiones celulares estructuralmente diferentes en el sistema nervioso. Estudios de distribución subcelular, han mostrado que aunque ambas actividades enzimáticas (GAD y GABA-T) se encuentran asociadas a las fracciones particuladas en experimentos de fraccionamiento celular, la fracción correspondiente a terminales nerviosas presinápticas contienen el más alto índice de actividad de GAD, mientras que, la actividad de GABA-T, se localiza predominantemente en la fracción mitocondrial.

#### a).- COMPARTAMENTALIZACION DEL METABOLISMO DEL ACIDO $\gamma$ -AMINO BUTIRICO

El descubrimiento de la distribución celular del metabolismo del ácido glutámico en dos compartimientos ("grande" y "pequeño") en el sistema nervioso (Berl y Col. 1961), ha centrado el interés sobre la forma en que ésta se encuentra relacionada al metabolismo del GABA y, consecuentemente, a su función en la transmisión nerviosa (Tapia, 1980). Diversos estudios han mostrado que la glutamina es un precursor importante de la síntesis del ácido  $\gamma$ -aminobutírico en el compartimiento o poza "grande" de glutamato (localizado en la terminal sináptica) y que aquel es convertido a glutamina en el compartimiento "pequeño" de glutamato (localizado predominantemente en la glía) (Van den Berg y Col. 1975). Ya que la poza "pequeña" (la cual está estrechamente asociada con la síntesis del glutamato) se localiza

preferencialmente en las células gliales, se ha postulado que el GABA capturado por la glía es convertido en glutamina, la cual es transportada al interior de la terminal nerviosa donde es desaminada para formar glutamato (poza "grande" ) y subsecuentemente GABA, formando así una poza disponible para su liberación.

Diversos reportes parecen apoyar esta hipótesis al demostrar que GABA marcado radiactivamente, derivado de glutamina marcada, es liberado por estímulo químico despolarizante con veratrina (Bradford y Col. 1978) o altas concentraciones de potasio ( Tapia y Gonzalez, 1978) en forma dependiente de calcio en sinaptosomas y rebanadas de corteza de raton, respectivamente. Aunque todos los estudios actuales parecen indicar que el GABA es liberado preferencialmente a partir de una poza sintetizada por glutamina, existen sin embargo, datos que demuestran la liberación de GABA derivado de piruvato, glutamato y glucosa radiactivos, los cuales sugieren la existencia de otra poza liberable (ver más adelante en la sección de liberación).

#### b).- INACTIVACION DEL GABA: CAPTURA

Captura neuronal. Toda la evidencia experimental actual propone que la terminación de la acción sináptica del GABA ( consecuente a su liberación al espacio sináptico) no depende de la acción enzimática de gradativa de la GABA-T ( su localización es predominantemente mitocondrial). El proceso que parece mediar este fenómeno, reside en la existencia de una captación del aminoácido por las terminales nerviosas y células gliales, a través de un mecanismo de cotransporte con los iones sodio y cloruro (Kanner, 1978). Diversos estudios han propuesto un doble sistema: de baja afinidad ( $K_m = 300 \mu M$ ) y alta afinidad ( $K_m = 10-40 \mu M$ ) (Martín, 1976). La estequiometría propuesta para el cotransporte de sodio-cloro-GABA parece ser de 2 o 3:1:1 (Kanner, 1978).

Captura glial. Las células gliales son también capaces de capturar el aminoácido a través de un mecanismo de alta afinidad, análogo al descrito anteriormente ( $K_m = 0.2-40 \mu M$ ) ( Van den Berg y Col. 1975). El significado fisiológico de esta captación parece estar relacionado a la formación de un ciclo metabólico de resíntesis del GABA, a partir de su remoción y catabolismo del espacio sináptico una vez

que ha sido liberado por la terminal nerviosa ( GABA----→ glutamato-  
----→ glutamina-----→ transporte a terminal nerviosa-----→ glutamato  
( poza "pequeña" ) -----→ GABA ).

### 3. LOCALIZACION NEURONAL DEL GABA

Practicamente no existe ninguna región del sistema nervioso central que se haya estudiado en la que el aminoácido no inhiba la actividad eléctrica neuronal. De cualquier forma, dentro de un contexto fisiológico general, su papel funcional y sus interacciones con otros sistemas neuronales en el cerebro son todavía sujetos de muchas investigaciones al momento actual.

#### a). DISTRIBUCION SUBCELULAR

Estudios de fraccionamiento subcelular en combinación con la medición de la actividad de la enzima responsable de la síntesis del GABA ( GAD), han demostrado que la mayor porción de la enzima se encuentra predominantemente concentrada (  $\approx$  85%) en las terminales nerviosas de la fracción sinaptosomal (Fonnum y Col. 1974 y 1978). Resultados experimentales con técnicas inmunohistoquímicas demostraron que la inmunorreactividad contra la GAD se confina principalmente en las terminales nerviosas de las neuronas GABAérgicas ( McLaughlin y Col. 1974 y 1975; Ribak y Col. 1976 y 1977; Barber y Col. 1978; Perez de la Mora, 1981 a). En adición a estos resultados, Ribak y colaboradores (1978) demostraron ( con una técnica de peroxidasa de alta sensibilidad ) que la inmunorreactividad contra la enzima puede ser detectada en la porción del soma de neuronas GABAérgicas solo después de haber inhibido el transporte axonal con colchicina .

#### b). DISTRIBUCION TISULAR

Diversos enfoques experimentales han sido utilizados en el estudio de la localización, identificación y mapeo de las vías GABAérgicas en el sistema nervioso. Investigaciones en las que se determinó el contenido tisular regional postmortem del aminoácido en el sistema nervioso ( Fahn y Côté, 1968; De Feudis y Col. 1970), indican que en los mamíferos, el GABA se localiza en el cerebro, tallo cerebral

y médula espinal, pero no en el tejido nervioso periférico como el nervio ciático, nervio esplénico, ganglios simpáticos o cualquier otro tejido periférico como el hígado, bazo y corazón. A semejanza de los otros transmisores no peptídicos ( aminoácidos y aminas biogénicas) y peptídicos (ver más adelante la sección de encefalinas) del sistema nervioso, el GABA parece tener una distribución discreta en el interior del SNC. En el mono (rhesus), los tubérculos cuadriqéminos y las regiones diencefálicas contienen las cifras más altas de GABA, mientras que las concentraciones más bajas se encuentran en los hemisferios cerebrales, tallo cerebral y médula espinal ( ver tabla I). En apoyo y en extensión a estos datos, también se han llevado a cabo la identificación de los sitios de captura del aminoácido mediante técnicas autorradiográficas ( Iversen y Schon, 1973; Hökfelt y Ljungdhal, 1975; Iversen, 1978). Colateralmente, algunos autores han intentado la lesión e interrupción quirúrgicas de vías GABAérgicas ( hipotéticamente propuestas ) en combinación con la cuantificación de los niveles de actividad de la GAD ( Kim y Col. 1971; Fonnum y Col. 1974; McGeer y Col. 1974; Storm-Mathisen, 1972 y 1976).

Aunque una cantidad considerable de información se ha obtenido con estos enfoques experimentales, el conocimiento que sobre la distribución de los sistemas GABAérgicos cerebrales han brindado es aún incompleto. En este sentido, y en extensión a este cuerpo de información, la implementación de técnicas inmunohistoquímicas basadas en la producción de anticuerpos específicos contra la GAD ofrecen, ahora, la oportunidad de caracterizar y mapear la distribución de las terminales nerviosas GABAérgicas en diversas regiones del SNC de mamíferos (Perez de la Mora y Col. 1981 a y b).

Desde un punto de vista histológico, el sistema GABAérgico se encuentra compuesto por neuronas que poseen proyecciones nerviosas largas ( Golgi tipo I) y cortas ( Golgi tipo II ) (Perez de la Mora y Col. 1981 a y b ; Fagg y Foster , 1983).

Sistema neuronal GABAérgico de proyecciones nerviosas largas. Se en-

TABLA I. Distribución regional del GABA en el encéfalo del mono (rhesus)\*. Modificada de Fhan, S. y Côté, L. J. Neurochem. 24, 1968.

REGION DEL ENCEFALO	MICROMOLAS/gr DE TEJIDO CONGELADO <sup>+</sup> E.S.M.	
Sustancia nigra	9.70 <sup>+</sup>	0.63
globus pallidus	9.54 <sup>+</sup>	0.91
hipotálamo	6.19 <sup>+</sup>	0.13
Tubérculos cuadrigéminos inferiores	4.70 <sup>+</sup>	0.29
núcleo dentado	4.30 <sup>+</sup>	0.47
tubérculos cuadrigéminos superiores	4.19 <sup>+</sup>	1.09
sustancia gris periacueductual	4.02 <sup>+</sup>	0.56
putamen	3.62 <sup>+</sup>	0.21
techo de la protuberancia	3.34 <sup>+</sup>	0.43
núcleo caudado	3.20 <sup>+</sup>	0.18
tálamo medial	3.00 <sup>+</sup>	0.14
tálamo lateral	2.68 <sup>+</sup>	0.09
corteza occipital	2.68 <sup>+</sup>	0.23
tálamo anterior	2.50 <sup>+</sup>	0.23
techo bulbar	2.27 <sup>+</sup>	0.22
núcleo olivar inferior	2.25 <sup>+</sup>	0.15
corteza frontal	2.10 <sup>+</sup>	0.01
corteza motora	2.09 <sup>+</sup>	0.10
corteza cerebelosa	2.03 <sup>+</sup>	0.23
centro semioval (sustancia blanca pura)	0.31 <sup>+</sup>	1.0

\* Los datos fueron obtenidos en el mono anestesiado. Obsérvese que las cifras más altas del contenido tisular endógeno del aminoácido se localizan en la sustancia nigra y el globus pallidus.



cuentra constituido por neuronas Golgi tipo I, que forman las vías de proyección que desde el punto de vista experimental, se ha propuesto, utilizan al GABA como transmisor inhibitorio (Fig.6 y Tabla II ). Los estudios inmunohistoquímicos mediante anticuerpos específicos contra la GAD sugieren que este sistema se compone de fibras nerviosas terminales de alta inmunorreactividad contra la enzima ( Perez de la Mora y Col. 1981 a). Se encuentran densamente distribuidas y confinadas en áreas subcorticales del cerebro ( sustancia nigra, globus pallidus, cuerpo geniculado lateral, sustancia innominada y tubérculos olfatorios), núcleos cerebelares profundos y, en el tallo cerebral, el núcleo vestibular lateral (ver Fig.6) (Perez de la Mora y Col.1981 a). Resultados experimentales obtenidos con estudios electrofisiológicos en estas áreas, sugieren que esta clase de terminales nerviosas pueden mediar sinapsis GABAérgicas inhibitorias a nivel postsináptico del tipo axosomático y axodendrítico ( Perez de la Mora y Col. 1981 a y b)

Sistema neuronal GABAérgico de proyecciones nerviosas cortas. Se compone de neuronas Golgi tipo II (interneuronas). En base a estudios inmunohistoquímicos se ha demostrado que este sistema presenta terminales nerviosas que exhiben una escasa o moderada inmunorreactividad contra la GAD (Pérez de la Mora y Col. 1981 a). Su distribución es extensa y de intensidad variable ( baja a alta) en el cerebro ( corteza cerebral , formación hipocampal, hipotálamo, cuerpo estriado, núcleo acumbens, área septal, colículos superiores) ; cerebelo ( corteza cerebelosa) ; y, tallo cerebral (sustancia gris periacueductal y formación reticular mesencefálica) y médula espinal (Ribak y Col. 1976,1977,1978 y 1979; Pérez de la Mora y Col. 1981 a y b; Fagg y Foster, 1983). Estudios electrofisiológicos y bioquímicos (ver una amplia revisión en Fagg y Foster, 1983) parecen apoyar la hipótesis de que este sistema forma circuitos neuronales locales, mediante los cuales modularía la actividad nerviosa local a través de la liberación de GABA a partir de interneuronas GABAérgicas que establecen sinapsis inhibitorias a nivel pre y postsináptico del tipo axosomático, axodendrítico y axoaxónico.

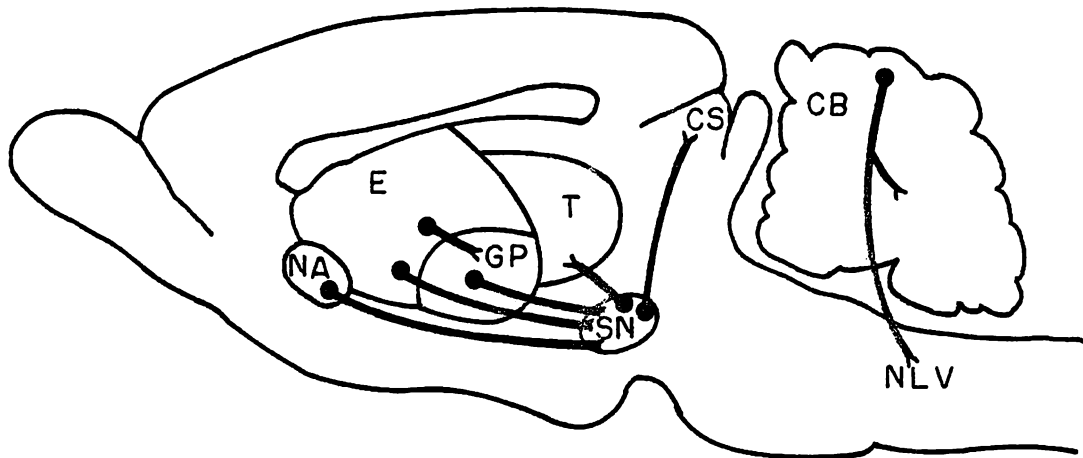


Fig. 6. Vista sagital del SNC de la ratona. Representación gráfica de los sistemas neuronales de proyección GABAérgicos propuestos en el cerebro de mamíferos. La evidencia experimental - disponible que ha permitido postular estas vías se encuentra resumida en la Tabla II. CB: Cerebelo; CS: Colículo Superior; E: Estriado; GP: Globus Pallidus; NA: Núcleo Acumbens; NVL: Núcleo Vestibular Lateral; SN: Sustancia Nigra; T: Tálamo.

(Modificada de Fagg, G. y Foster, A. Neuroscience 9: 701-719, 1983).

Tabla II. Proyecciones neuronales GABAérgicas propuestas en el cerebro de mamíferos: resumen de evidencias experimentales que apoyan su existencia.

VIA	* EVIDENCIA EXPERIMENTAL:	
	CRITERIO PRESINAPTICO	CRITERIO POSTSINAPTICO
Ganglios basales y núcleos asociados		
De globus pallidus a:		
sustancia nigra	GAD	
De núcleo acumbens a:		
sustancia nigra	GAD	
área ventro-tegmental talámica	GAD	
Del estriado a:		
globus pallidus	GAD	
sustancia nigra	GAD; C; L	AF
De la sustancia nigra a:		
colículo superior	GAD	
tálamo	GAD	
Células cerebelares de Purkinje	GAD; L	IA; AF

\* Las evidencias experimentales enlistadas en esta tabla se extractaron de estudios que han utilizado el "criterio presináptico", midiendo el contenido tisular de la GAD, del GABA (C), o la liberación evocada de este último (L). Complementariamente, se enlistan evidencias derivadas de estudios que utilizaron los "criterios postsinápticos" de identidad de acción (IA) y antagonismo farmacológico (AF) de la transmisión GABAérgica cerebral. (Modificada de Fagg, C. y Foster, A. Neuroscience 9: 701-719, 1983).

GABA y ganglios basales. El concepto neuroanatómico "ganglios basales" se ha ligado clásicamente para designar a las masas de materia gris localizadas subcorticalmente en el cerebro de mamíferos. Tradicionalmente (Carpenter, 1984) se reconocen dos divisiones anatómicas mayores que se han asociado a funciones nerviosas distintas; el cuerpo estriado, conformado por el putamen, núcleo caudado y globus pallidus, ha sido relacionado primariamente con aspectos integrativos de las funciones somato-motoras; el complejo nuclear amigdalino, con una profusa inervación aferente de regiones relacionadas con funciones olfatorias, presenta conexiones recíprocas con varias partes del hipotálamo y es considerado como una parte integral del sistema límbico. Esta estructura se ha asociado al control neural de funciones viscerales, endocrinas y conductuales.

De cualquier forma, en el transcurso de los últimos años, diversos autores (ver una amplia revisión de citas en Carpenter, 1984; García-Rill, 1986) han incluido, bajo el rubro de "ganglios basales", a diversas áreas cerebrales subcorticales. Sin embargo, en función de los objetivos del presente trabajo de tesis, se incluirán al núcleo caudado (NC) y putamen (colectivamente referidos como estriado), globus pallidus (GP) y la sustancia nigra (SN), como una porción de sus principales componentes estructurales.

El sistema más conspicuo y mejor definido de neuronas de proyección GABAérgicas en el sistema nervioso central se encuentra asociado a los ganglios basales. Un cuerpo sustancial de evidencias experimentales indica que los cuerpos celulares de estas neuronas se localizan principalmente en el núcleo caudo-putamen (estriado) y el globus pallidus, los cuales envían proyecciones nerviosas terminales a la sustancia nigra (proyecciones estriado-nigrales y pálido-nigrales, respectivamente) (ver Fig. 6 y Tabla II) (Fagg y Foster, 1983). De hecho, la sustancia nigra contiene los niveles más altos de GABA y GAD localizados en terminales nerviosas del sistema nervioso (Tabla I) (Fahn y Côté, 1968; Kim y Col. 1971; Okada y Col. 1971; Hattori y Col. 1973; Fonnum y Col. 1974; Fahn, 1976; Okada, 1976; Ribak y Col. 1976), los cuales son reducidos significativamente por la ablación del estriado o el globus pallidus, o por cortes quirúrgicos di

señados especialmente para separar parcial o totalmente estos núcleos de la sustancia nigra (Kim y Col. 1971; McGeer y Col. 1971; Hattori y Col. 1973; Fonnum y Col. 1974; Brownstein y Col. 1977; Jessel y Col. 1978). Se ha demostrado que las aferencias nigrales se originan primordialmente de la porción posterior del estriado, con una porción menor de fibras originadas en su parte rostral (Brownstein y Col. 1977; Jessel y Col. 1978) y un número aún menor a partir del globus pallidus (Hattori y Col. 1973; Fonnum y Col. 1978). Topográficamente, las terminales nerviosas de las neuronas GABAérgicas situadas más rostralmente en el estriado inervan la parte reticulada (pars reticulata) de la sustancia nigra, mientras que, aquellas situadas en su porción caudal y en el globus pallidus inervarán la zona compacta (pars compacta) de esta estructura (Brownstein y Col. 1977; Jessel y Col. 1978). En adición a las proyecciones estriado-nigral y pálido-nigral, el GABA parece ser el transmisor de una vía estriado-palidal (ver Fig.6 y Tabla II) (McGeer y Col. 1971; Hattori y Col. 1973; Pycock y Col. 1976; Jessel y Col. 1978; Pasik y Col. 1979). Las aferentes palidales se encuentran topográficamente dispuestas en secuencias dorsoventrales y rostrocaudales. Los cuerpos celulares localizados en la cabeza del núcleo caudado proyectan sus terminales nerviosas a las porciones dorsales y rostrales del globus pallidus; a partir del putamen, las proyecciones se distribuyen extensivamente a sus regiones ventrales y caudales. La parte precomi sural del putamen proyecta exclusivamente al pallidum. En apoyo a la existencia de esta vía de proyección GABAérgica, diversos autores han reportado que el globus pallidus contiene uno de los niveles más altos de GABA y GAD localizados en terminales nerviosas en el cerebro, solo superados por la sustancia nigra (ver Tabla I) (Fahn y Côté. 1968; De Feudis y Col. 1970; Okada y Col. 1971; Balcom y Col. 1975; Fahn, 1976; Fonnum y Col. 1978; Ribak y Col. 1979).

Aunado a todo el cuerpo de información concerniente a los sistemas de proyección GABAérgicos de estas estructuras de los ganglios basales, otros reportes experimentales parecen apoyar la idea de que el GABA es también el transmisor, a este nivel, de sistemas neuronales inhibitorios locales formados por interneuronas situadas en el es---

triado, globus pallidus y sustancia nigra (McGeer y McGeer, 1975 ; Nagy y Col. 1978; Oertel y Mugnaini, 1984).

#### 4. LIBERACION DEL GABA

##### a). ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES EN EL ESTUDIO DE LA LIBERACION DEL GABA

Diferentes enfoques metodológicos han permitido estudiar los fenómenos implicados en la liberación del GABA en distintas preparaciones del tejido nervioso (rebanadas de cerebro, sinaptosomas, perfusión de zonas cerebrales en el animal vivo con cánulas de infusión-extracción de líquido, etc.). Los procedimientos de uso general implican dos alternativas: medición directa, por técnicas bioquímicas especiales, del aminoácido endógeno liberado por el tejido; o, por el cargo exógeno del mismo aminoácido en el tejido o de precursores metabólicos marcados radiactivamente (glucosa, piruvato, glutamato y glutamina). Desde este punto de vista, se ha establecido que la liberación del GABA en el tejido nervioso tiene dos orígenes celulares posibles; neuronal y glial.

Liberación neuronal. Existen dos tipos de liberación neuronal fisiológicamente distinguibles desde el punto de vista experimental: basal ( condiciones de reposo) y estimulada ( inducida por la despolarización nerviosa). Toda la evidencia experimental actual sugiere la presencia de dos dominios metabólicamente independientes en la terminal nerviosa, que dan origen a dos sitios de almacenamiento fisiológicamente diferentes, a partir de los cuales el GABA puede ser liberado. En este sentido, el aminoácido liberado en condiciones "basales" sería sintetizado preferencialmente a partir de la poza "grande" de glutamato ( Tapia y Gonzalez, 1978; Van der Heyden y Col. 1980b). Diversos autores han propuesto que esta es la vía metabólica que forma la poza de "síntesis reciente", a partir de la cual el GABA es liberado en condiciones de reposo ( Ryan y Roskoski, 1975; Tapia, 1976; Gauchy y Col. 1977). Por otro lado, se ha postulado que la liberación estimulada es dependiente de la presencia del ión  $Ca^{++}$  y deriva

del GABA sintetizado en la poza "pequeña" de glutamato ( de la cual es importante precursor la glutamina de origen glial) ( Tapia y Gonzalez, 1978; Čanžek y Reubi, 1980; Gauchy y Col. 1980), así como también por el GABA capturado por el mecanismo de alta afinidad en la terminal nerviosa ( Iversen y Neal, 1968; Iversen, 1972).

Liberación glial. Como ya se mencionó anteriormente, el GABA es capturado por la glia a través de un mecanismo de alta afinidad análogo al descrito para la terminal nerviosa. En base a este hecho, varios estudios experimentales establecieron que la glia es capaz de liberar el aminoácido solo en condiciones de despolarización ( ejem. altas concentraciones de potasio) y que, esta liberación, es independiente de la presencia de calcio, lo que ha hecho concluir que la dependencia del ión en la liberación estimulada es un criterio razonable para fundamentar su origen neuronal ( Minchin , 1975; Adams y Brown, 1979; Bowery y Col. 1979 b; Neal y Bowery, 1979).

#### b) METODOS Y ESTUDIOS DE LA LIBERACION IN VIVO DEL GABA

Diversos autores han empleado los métodos de perfusión in vivo para estudiar la liberación en condiciones de reposo ( no estimulación) e inducida ( despolarización por altas concentraciones de potasio, estímulo eléctrico , neurotransmisores, fármacos, toxinas, etc.) del ácido  $\gamma$ -aminobutírico en el sistema nervioso central.

Uno de los acercamientos experimentales han hecho uso de las copas corticales para estudiar la liberación de este aminoácido en regiones de la superficie del cerebro. Abdul-Ghani y colaboradores ( 1979 y 1980), reportaron la liberación "espontánea" ( no estimulación) de GABA endógeno de la corteza visual y sensorimotora solo después de la adición de inhibidores de la GABA-T al medio de perfusión (  $\gamma$ -vinil-GABA y  $\gamma$ -acetilen-GABA). En estas condiciones experimentales, la liberación del aminoácido fue aumentada por la estimulación eléctrica del plexo braquial o por la adición de la toxina tityus al medio de perfusión. Con esta misma herramienta de perfusión, se ha detectado también la liberación inducida de GABA endógeno en la corteza de

la rata por la despolarización con altas concentraciones de potasio en el medio de perfusión en presencia de calcio ( Clark y Collins, 1976) o , en ausencia de despolarización, por la adición del ionóforo de calcio A23183 en el medio de perfusión en presencia de calcio ( Collins , 1977). En la corteza motora, otros estudios han reportado la liberación inducida del GABA radiactivo ( administrado exógenamente ) por la estimulación eléctrica local ( Reiffenstein, 1979).

La utilización del dispositivo de cánulas ventriculares de infusión y extracción de líquido también ha favorecido el estudio de la liberación de GABA radiactivo en el sistema ventricular cerebral del gato. Velluci y Webster (1980) reportaron la liberación estimulada del aminoácido radiactivo por la aplicación de altas concentraciones de potasio en el medio de perfusión en el cuarto ventrículo.

Por otro lado, diversos autores emplearon diferentes herramientas de perfusión para estudiar la liberación in vivo de GABA en estructuras neurales situadas en el interior del parénquima nervioso. Con el sistema de cánulas concéntricas Gaddum-Myers para la infusión y extracción de líquido, Mecker y Myers (1979) reportaron la liberación "espontánea" de GABA-<sup>14</sup>C (recién sintetizado a partir de glucosa radiactiva ) en el núcleo ventromedial del hipotálamo. Con un dispositivo similar, Dietl y Philippu (1979) estudiaron los patrones de liberación "espontánea" de GABA endógeno en la porción posterior del hipotálamo del gato anestesiado. Sus resultados sugieren que la tasa de liberación de este aminoácido varía rítmicamente y en forma fásica durante el transcurso de la perfusión: fases de altas tasas de liberación se separan unas de otras por períodos fásicos de niveles bajos de liberación del aminoácido ( generalmente de 60-70 minutos de duración ). En correlación a este resultado, Cattabeni y colaboradores (1978) reportaron fluctuaciones circádicas de los niveles tisulares del GABA en el hipotálamo de la rata. Sin embargo, todavía no se conoce el significado funcional de este fenómeno y su relación al proceso secretorio del aminoácido en esta estructura.



Con el uso de herramientas de perfusión que han incorporado membranas de diálisis también se ha podido estudiar la liberación in vivo del GABA en el sistema nervioso central. Hamberger y colaboradores ( 1985) emplearon este dispositivo para estudiar la liberación in vivo del aminoácido a partir de estructuras neurales del parénquima cerebral del conejo. Sus resultados demuestran que los niveles de liberación "espontánea" de GABA endógeno hacia el líquido extracelular del hipocampo se correlacionan con los niveles del contenido tisular del aminoácido de esta región. En otra serie de resultados, estos autores han reportado que la adición de diferentes concentraciones del ácido nipecótico ( potente inhibidor de la recaptura neuronal y glial del GABA ) al medio de perfusión produce un aumento directamente proporcional de los niveles de GABA en el líquido extracelular del hipocampo ( Hamberger y Col. 1985). Aunado a esto, la despolarización local inducida por la administración de altas concentraciones de potasio ( 56-80 mM ) en el medio de perfusión conlleva un aumento significativo de los niveles extracelulares de GABA en la misma estructura. Este efecto fue significativamente mayor con la adición simultánea de ácido nipecótico en el medio de perfusión.

c) LIBERACION IN VIVO DEL GABA EN LOS GANGLIOS BASALES: REGULACION POR OTROS SISTEMAS NEUROTRANSMISORES

Los ganglios basales cumplen una función primordial en el control de la conducta motora, un hecho que es corroborado por la presentación de una amplia variedad de trastornos motores como consecuencia del funcionamiento anormal de estas estructuras subcorticales. En modelos experimentales con animales, las manipulaciones locales tendientes a afectar la transmisión GABAérgica asociada a estas regiones, dan origen, generalmente, a diferentes tipos de trastornos en el movimiento y la postura (Scheel-Krüger y Col. 1979; Björklund y Col. 1980; Pycock, 1980). Dentro de sus sistemas neuronales bioquímicamente identificados, las neuronas GABAérgicas forman el sistema de inervación local (interneuronal) y de proyección (eferente) más abundante. Con el fin de investigar los procesos regulatorios que controlan la actividad GABAérgica neuronal a este nivel, diversos au

tores han estudiado la liberación in vivo del GABA en áreas donde se proyectan y concentran sus terminales nerviosas. Así, la técnica de perfusión intracerebral push-pull ha permitido obtener un cuerpo sustancial de información sobre la liberación in vivo del aminoácido en estas estructuras neurales. A continuación revisaremos algunas evidencias experimentales que nos documentaran en tal sentido.

Besson y colaboradores (1982, 1984 y 1986) han estudiado la regulación de la liberación de GABA-H<sup>3</sup> endógeno (recién sintetizado a partir de glutamina-H<sup>3</sup>) en diversas estructuras de los ganglios basales del gato y la rata anestesiados. En la rata, la liberación "espontánea" de GABA-H<sup>3</sup> es aumentada significativamente en el estriado por la despolarización local del tejido con la aplicación de 30 mM de potasio y en presencia de calcio en el medio de perfusión, lo cual sugiere el origen neuronal del GABA-H<sup>3</sup> liberado durante la condición despolarizante (la liberación glial del GABA que es inducida por despolarización no es dependiente de calcio). En apoyo a tal hipótesis, , estos mismos autores demostraron aumentos significativos en la liberación del aminoácido marcado bajo condiciones despolarizantes análogas en la sustancia nigra ( Besson y Col. 1986). En este sentido, Van der Heyden y colaboradores (1979 b) han reportado que la liberación "espontánea" de GABA endógeno en la sustancia nigra puede ser aumentada significativamente por la administración de alto potasio( 40 mM) y calcio en el medio de perfusión. Dicho efecto es antagonizado por la adición de una alta concentración de magnesio (8mM) en un medio de perfusión con alto potasio y sin calcio. En otra serie de resultados, el mismo autor ( Van der Heyden y Col. 1979 b) demostró que la aplicación nigral del ácido aminooxiacético ( inhibidor de la degradación enzimática del GABA) incrementa la liberación "espontánea" local del aminoácido. En el mismo animal modelo, Kondo e Iwatsubo (1978) estudiaron la liberación de GABA-H<sup>3</sup> (administrado exógenamente) en presencia del ácido aminooxiacético e inhibidores de la recaptura preferencial glial (  $\beta$ -alanina) y neuronal (ácido carboxílico CIS-3-aminociclohexano) del GABA. Sus resultados demuestran que la estimulación eléctrica del estriado o el globus pallidus induce un incremento de la liberación "espontánea" del

GABA-H<sup>3</sup> en la sustancia nigra ipsilateral. En el gato anestesiado se han reportado resultados análogos en la región nigral a consecuencia de la estimulación eléctrica de la cabeza del núcleo caudado ipsilateral (Gauchy y Col. 1980; Delgado y Col. 1985). Adicionalmente, la aplicación local de estímulo eléctrico despolarizante en el estriado y globus pallidus o, químico con altas concentraciones de potasio (20-40 mM) en la sustancia nigra, induce, también, un aumento significativo de los niveles de GABA-H<sup>3</sup> liberados en el perfusado de estas estructuras (Kondo e Iwatsubo, 1978). Comparativamente, el incremento más ostensible se obtuvo en el globus pallidus, explicable por la altísima densidad de terminales nerviosas GABAérgicas que innervan esta región cerebral. Dentro de la misma línea de estudios y en apoyo a los resultados anteriormente mencionados, Gauchy y colaboradores (1980) reportaron resultados análogos en la sustancia nigra y la región pálido-entopeduncular. En ambos sitios, la liberación "espontánea" de GABA-H<sup>3</sup> (recién sintetizado a partir de glutamina-H<sup>3</sup> exógena) aumenta significativamente por la aplicación local de 43mM de potasio. El nivel de GABA-H<sup>3</sup> liberado durante el estímulo despolarizante fue también de mayor magnitud en la región pálido-entopeduncular (trece veces el valor de la liberación "basal" promedio) que en la sustancia nigra (cinco veces). El mismo efecto se obtuvo cuando se evocó la liberación del GABA-H<sup>3</sup> en las mismas estructuras por la estimulación eléctrica del núcleo caudado ipsilateral.

A partir de otra serie de estudios, algunos autores han demostrado la regulación de la liberación del GABA por diversos fármacos y agentes neurotransmisores putativos de estas estructuras subcorticales. Así, dentro de las líneas de evidencia experimental disponible en este sentido, es la que sugiere la existencia de relaciones funcionales recíprocas entre los sistemas GABAérgicos y encefalinérgicos de los ganglios basales. Como ya se revisó anteriormente en este mismo capítulo y como se expondrá a continuación en el de encefalinas (inciso "C"), el GABA y las encefalinas se encuentran en altas concentraciones en el estriado y el globus pallidus de mamíferos, en donde se les ha asignado funciones neurotransmisoras (Oertel y Col. 1983 y 1984; Aronin y Col. 1984; Oertel y Mugnaini, 1984). En preparaciones

in vitro e in vivo , ambas sustancias son liberadas de estos tejidos bajo condiciones de reposo ( liberación "espontánea" , no estimulada) y despolarizantes, y producen efectos electrofisiológicos inhibitorios. Desde un punto de vista histológico, ambos transmisores se encuentran contenidos individualmente en sistemas neuronales que forman vías de proyección (eferencias) o circuitos de inervación local (interneuronas). En extensión a este cuerpo de información, algunos trabajos reportan la coexistencia de estos mensajeros en una misma subpoblación neuronal estriadopalidal( Oertel y Col. 1983 y 1984; Aronin y Col. 1984; Zahm y Col. 1985 ). Desde un punto de vista morfológico, no disponemos de suficientes evidencias estructurales que permitan establecer la interrelación funcional directa de los dos sistemas transmisores mediante la formación de algún tipo de contacto sináptico ( Oertel y Mugnaini, 1984). Sin embargo, los resultados de estudios farmacológicos in vitro e in vivo sugieren la existencia de relaciones funcionales recíprocas complejas entre la transmisión GABAérgica y encefalinérgica estriatal.

En este contexto, se han reportado acciones modulatorias de los opioides sobre la función GABAérgica estriatal. La administración sistémica (subcutánea) de dosis variables de morfina<sup>3</sup>, intraventricularmente de  $\beta$ -endorfina, induce una disminución en la tasa de recambio del contenido tisular de GABA en el núcleo caudado y un incremento en el globus pallidus de la rata( Moroni y Col. 1978). Dichos cambios son dependientes de la dosis y pueden ser inhibidos por el antagonista opioide naltrexona (Moroni y Col. 1978). Resultados análogos también se obtienen por la inyección local de los mismos fármacos en las estructuras neurales antes citadas ( Moroni y Col. 1979). En apoyo a estos resultados, Van der Heyden y colaboradores (1980 c) demostraron un efecto inhibitorio sobre la liberación "espontánea" in vivo de GABA endógeno por la administración local de morfina en el estriado de la rata anestesiada. El efecto es antagonizado por la aplicación simultánea de nalorfina en el medio de perfusión. La inhibición , que sobre la liberación de GABA parecen ejercer los opioides a nivel estriatal, se ve apoyado por otros resultados experimentales en preparaciones in vitro de tejido neural de no mamífe--

ros. En las células amacrinas de la retina del pez gato y carpa dorada, la aplicación exógena de encefalinas y opiáceos conlleva a un decremento de la liberación estimulada de GABA-H<sup>3</sup> por altas concentraciones de potasio (Djamgoz y Col. 1981; Chin y Lam, 1982). Watt y colaboradores ( 1985 a y b ) han reportado un efecto similar en preparaciones de la retina de pollo, el cual es antagonizado por naloxona ( Watt y Col. 1985 a ).

Por último, en otra serie de trabajos experimentales, se ha investigado el posible efecto regulatorio que tiene el GABA sobre su propia liberación. Sabemos que la liberación de transmisores es regulada no solamente por la actividad de las células nerviosas, sino que, también, por receptores localizados en sus propias terminales sinápticas ( Chesselet, 1984). En tal forma, se propone que los llamados "autorreceptores" participan en el funcionamiento regulatorio del control negativo que limita la liberación del transmisor. En experimentos in vivo, se ha demostrado que la aplicación local de picrotoxina (antagonista al receptor GABAérgico) induce un incremento significativo de la liberación "espontánea" de GABA-H<sup>3</sup> ( Kondo e Iwatsubo, 1978) o de GABA endógeno ( Van der Heyden y Col. 1980 c) en el estriado de la rata anestesiada. Por otro lado, la administración local del antagonista muscimol da origen al efecto contrario, el cual es antagonizado por la aplicación simultánea de picrotoxina ( Van der Heyden y Col. 1980 c ; Korf, 1985). En conjunto, estos datos sugieren que la liberación in vivo de GABA podría regularse también a través de un mecanismo GABAérgico endógeno, posiblemente al nivel de autorreceptores situados en la propia terminal GABAérgica.

##### 5) ACCIONES SINAPTICAS DEL GABA: BASES IONICAS

Los estudios llevados a cabo en la unión neuromuscular de crustáceos permitieron estudiar la acción electrofisiológica del GABA. El efecto inhibitorio que sobre la actividad neuronal ejerce el GABA se encuentra relacionado a un incremento de la permeabilidad selectiva al ión cloruro en la membrana de la célula postsináptica (medida como un aumento en su conductancia transmembranal) ( Krnjević, 1976 ; Ta-

keuchi, 1976). En esta forma, el cloro tiende a distribuirse a través de la membrana en función de su potencial de equilibrio, el cual es similar al potencial de reposo de la célula. El efecto resultante de este fenómeno electroquímico se traduce en la fijación del potencial de membrana muy cerca al de su nivel en condiciones de reposo, lo cual da como resultante una baja sensibilidad de la membrana postsináptica a la acción del estímulo despolarizante ( estado de hiperpolarización ). En la misma preparación se ha demostrado que los axones que median la inhibición postsináptica de los músculos del acocil, también envían colaterales que ejercen la misma acción inhibitoria en las terminales axónicas que causan estimulación excitatoria ( contracción ) ( Obata, 1976). La acción del neurotransmisor implica el mismo incremento en la permeabilidad al cloro, pero la inhibición, en este caso, es mediada a través de un efecto despolarizante de la terminal nerviosa excitatoria ( en base a que estas terminales contienen una concentración relativamente más alta de cloro en condiciones de reposo ) ( Obata, 1976). Esto da como resultado un decremento en el potencial de reposo membranal ( menos negativo, más hacia el estado de despolarización ) y, consecuentemente, una baja posibilidad en la liberación cuántica del transmisor excitador por su terminal.

Las acciones electrofisiológicas del GABA observadas en crustáceos como el acocil (postsinápticas y presinápticas inhibitorias), parecen ser esencialmente las mismas que se han podido determinar en el sistema nervioso de vertebrados. Las investigaciones de los efectos del aminoácido sobre las neuronas de distintas regiones neurales del SNC de vertebrados han demostrado que la acción inhibitoria es mediada a través del primer mecanismo iónico descrito por Obata (1976) ( Curtis y Johnston, 1974; Krnjević, 1974). Sin embargo, otra línea de evidencias sugieren que el transmisor puede ejercer acciones inhibitorias presinápticas mediante el segundo tipo de mecanismo propuesto en el acocil por Obata ( 1976), como en el caso de las aferentes primarias de neuronas localizadas en ganglios sensoriales ( Curtis y Johnston, 1974; Krnjević, 1974).

C). LOS PEPTIDOS OPIOIDES, ENCEFALINAS, COMO UN MODELO DE ESTUDIO DE MENSAJEROS PEPTIDICOS

1.- INTRODUCCION

a). EL CONCEPTO DE "LIGANDO ENDOGENO"

El primer paso en la historia moderna del opio se dió en 1803, cuando el farmacéutico alemán Friedrich Sertüner aisló un alcaloide del opio al que llamó morfina. Este hallazgo estableció que el alcaloide era el responsable de las acciones más importantes del opio. Sin embargo, pocos avances significativos en el conocimiento de esta droga se registraron en la centuria siguiente. A partir de la segunda mitad del presente siglo, era ya claro que la efectividad de los opiáceos (análogos de la morfina) no solo dependía de su estructura química, sino de las distintas disposiciones que ésta puede tomar en el espacio (estereoquímica). Estas observaciones, aunadas al hecho de que los opiáceos actuaban aún a dosis bajas, indicaban que el efecto farmacológico de estas sustancias debía depender de su "ajuste" a receptores hipotéticos existentes en los animales. Sin embargo, la hipótesis no era ampliamente aceptada, ya que los alcaloides del opio no se producen ni se encuentran en forma natural en el organismo de los animales. No obstante, la evidencia experimental hizo desvanecer dudas y objeciones; en 1973, los doctores Pert y Snyder (1973) demostraron la existencia de receptores específicos para los opiáceos en el sistema nervioso y, hacia 1975, Hughes y colaboradores (1975) reportaron (a partir de tejido cerebral) la purificación, identificación y síntesis de dos pentapéptidos que reproducían las acciones de la morfina en ensayos biológicos. Fué el hallazgo de estos "ligandos endógenos" a los que llamaron encefalinas (Metionina-encefalina=Tir-Gli-Gli-Fen-Met y Leucina-encefalina=Tir-Gli-Gli-Fen-Leu, siendo Tir=tirosina; Gli=glicina; Fen=fenilalanina; Met=metionina y Leu=leucina).

## 2.- FAMILIAS DE PEPTIDOS OPIOIDES: ORIGEN GENICO Y BIOSINTESIS DE LAS ENCEFALINAS

La biosíntesis de los péptidos opioides en el sistema nervioso parece estar dirigida a través de los mismos mecanismos bioquímicos descritos en forma general en la génesis de neuropéptidos y hormonas polipeptídicas (Krieger, 1983; White, 1985) : síntesis ribosomal somática de polipéptidos precursores de alto peso molecular (pre-pro-polipéptidos), a partir de los cuales son escindidas las estructuras de los péptidos bioactivos por proteólisis limitada durante su transporte en gránulos de secreción hasta las terminales sinápticas. Los sitios de ruptura enzimática se realizan en los puntos de existencia de secuencias de aminoácidos básicos (Fricker y Snyder, 1983).

A partir del descubrimiento de las encefalinas, la lista de péptidos opioides aislados e identificados en el sistema nervioso fue en aumento constante ( el término "péptidos opioides" ha sido aplicado usualmente a "aquellos péptidos presentes en forma natural en los tejidos, con propiedades biológicas similares a las de los opiáceos" ). En los últimos siete años, se ha descubierto el origen biosintético de los péptidos opioides conocidos al momento actual, al nivel de sus estructuras genómicas que codifican para su síntesis, ARN-mensajeros y moléculas protéicas precursoras ( Akil y Col. 1984; White, 1985). La tabla III, enlista los péptidos de la familia opioide extraídos y secuenciados a partir del tejido nervioso de mamíferos. Como se ve, las distintas especies de péptidos tienen su origen a partir de tres moléculas precursoras (ver Fig.7): el precursor de la  $\beta$ -endorfina/ACTH (también conocido como Proopiomelanocortina o POMC), el precursor de encefalinas (conocido como Proencefalina o Proencefalina A) y el precursor de la Dinorfina/Neo-endorfina (llamado Prodinorfina o Proencefalina B).

La figura 7A muestra el trazado esquemático del precursor  $\beta$ -endorfina/ACTH. En su extremo carboxilo terminal se encuentra la secuencia de 91 aminoácidos de la  $\beta$ -lipotropina ( $\beta$ -LPH), la cual contiene las secuencias del péptido de 31 aminoácidos llamado  $\beta$ -endorfina ( $\beta$ -END)



TABLA III

Precursores y miembros peptídicos de la Familia de los Péptidos --  
 Opioides: estructura y clasificación. Nótese la estrecha homología  
 estructural que guardan entre sí la gran mayoría de las especies -  
 peptídicas. Ala = alanina; Arg = arginina; Asn = asparagina; Asp =  
 aspártico; Gln = glutamina; Gli = glicina; His = histidina ; Ile =  
 isoleucina; Leu = leucina; Met = metionina; Fen = fenilalanina; Pro =  
 prolina; Ser = serina; Tre = treonina; Trp = triptofano; Lis = lisina;  
 Val = valina. (Tomada de Akil, H. y Col. Ann. Rev. Neurosci. 7, 1984).

$\beta$  - END/ACTH  
(Porcina)

PROENCEFALINA  
(Humana)

PRODINORFINA  
(Porcina)

$\beta$ -Endorfina

Tir-Gli-Gli-Fen-Met-  
 Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-  
 Gln-Tre-Pro-Leu-  
 Val-Tre-Leu-Fen-Lis-  
 Asn-Ala-Ile-Val-Lis-  
 Asn-Ala-His-Lis-  
 Lis-Gli-Gln

(Met) encefalina

Tir-Gli-Gli-Fen-Met

$\alpha$ -Neo - endorfina:

Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-  
 Arg-Lis-Tir-Pro-Lis

(Leu) encefalina:

Tir-Gli-Gli-Fen-Leu

$\beta$ -Neo-endorfina:

Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-  
 Arg-Lis-Tir-Pro.

(Met) encefalina-Arg<sup>6</sup>-Fen<sup>7</sup>:

Tir-Gli-Gli-Fen-Met-  
 Arg-Fen

Dinorfina A-(1-8):

Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-  
 Arg-Arg-Ile.

(Met) encefalina-Arg<sup>6</sup>-Gli<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>:

Tir-Gli-Gli-Fen-Met-  
 Arg-Gli-Leu

Dinorfina A-(1-17):

Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-  
 Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-  
 Lis-Leu-Trp-Asp-  
 Asn-Gln.

Péptido E:

Tir-Gli-Gli-Fen-Met-  
 Arg-Arg-Val-Gli-Arg-  
 Pro-Gli-Trp-Trp-Met-  
 Asp-Tir-Gln-Lis-Arg-  
 Tir-Gli-Gli-Fen-Leu

Dinorfina B-(1-13):

Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-  
 Arg-Arg-Gln-Fen-Lis-  
 Val-Val-Tre.

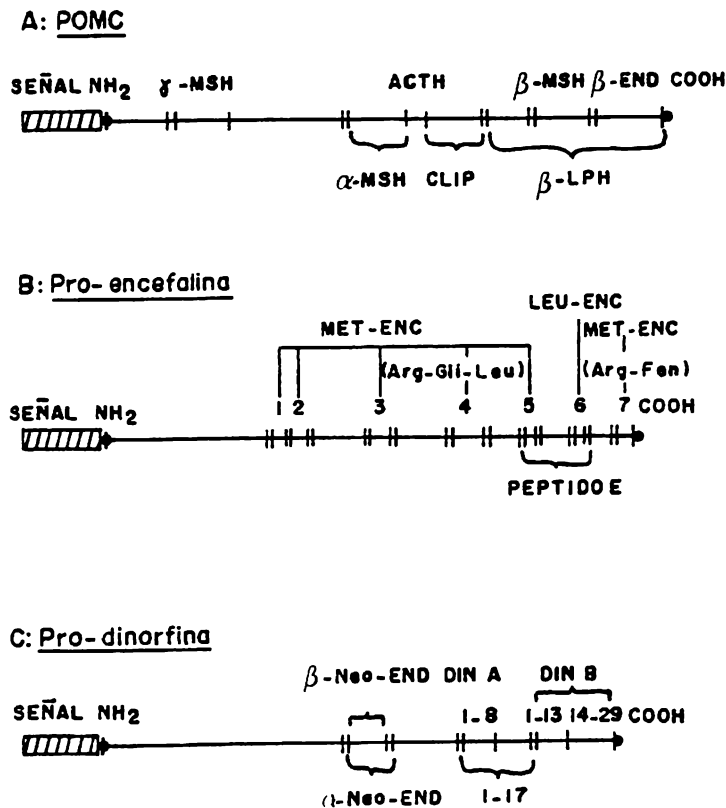


Fig. 7. Representación esquemática de las estructuras protéicas precursoras de las tres familias de péptidos opioides. La estructura de la  $\beta$ -END/ACTH se determinó inicialmente con técnicas bioquímicas usadas en la química de proteínas y confirmada posteriormente por ingeniería genética (clonación de ADN complementario). Las estructuras de los precursores Proencefalina y Prodinorfina se descubrieron a partir del estudio de la clonación del ADN complementario. Las líneas verticales representan los sitios de ruptura enzimática, a partir de los cuales se escinden los péptidos con actividad opioide presentados en la Tabla III (tomado de Akil, H. y Col. Ann. Rev. Neurosci. 7, 1984).

y, en algunas especies, a la  $\beta$ -MSH. En la región media se localiza la secuencia de la ACTH-(1-39), la cual puede ser procesada para dar origen a la  $\alpha$ -MSH y CLIP (péptido del lóbulo intermedio similar a corticotrofina o a la ACTH-(18-39) (Bradbury y Col. 1976; Chretien y Col. 1976; Eipper y Mains, 1978; Guillemin y Col. 1976; Li y Chang, 1976; Mains y Col. 1977; Roberts y Herbert, 1977 a y b). En la porción cercana al amino terminal, se encuentra la secuencia de la  $\gamma$ -MSH y un fragmento peptídico altamente conservado desde el punto de vista estructural en las diferentes especies de mamíferos, el cual posiblemente posea neuroactividad. En resumen, este gran precursor da origen a un péptido con actividad opioide ( $\beta$ -END) y, potencialmente, a tres péptidos similares a la hormona MSH ( $\alpha$ -MSH de la ACTH,  $\beta$ -MSH y  $\gamma$ -MSH) (Drouin y Goodman, 1980; Kita y Col. 1979; Nakanishi y Col. 1979, 1981; Roberts y Herbert, 1977a, b; Roberts y Col. 1979; Tsukada y Col. 1981; Whitfeld, 1982).

El precursor Proencefalina A (Fig. 7B) presenta la secuencia de varios péptidos con actividad opioide (Hughes y Col. 1975; Kimura y Col. 1980; Mizuno y Col. 1980; Gubler y Col. 1981; Comb y Col. 1982 a,b; Noda y Col. 1982). En la actualidad se han determinado completamente las secuencias de los nucléotidos del ADN complementario en el bovino y el ARN mensajero del humano (Comb y Col. 1982 a,b; Gubler y Col. 1982; Noda y Col. 1982). En contraste al precursor  $\beta$ -END/ACTH, todos los péptidos activos producidos por la Proencefalina-A poseen actividad opioide. Su estructura contiene siete péptidos con la secuencia activa (Met) o (Leu) encefalina. De los siete, cuatro son producidos como (Met) encefalina (Tir-Gli-Gli-Fen-Met); dos más como (met) encefalina -Arg<sup>6</sup>-Fen<sup>7</sup> y (Met) encefalina Arg<sup>6</sup>-Gli<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (se ha demostrado que estos dos últimos péptidos son constituyentes normales de las células cromafines de la adrenal y neuronas encefalinérgicas del cerebro) (Rossier y Col. 1980; Stern y Col. 1980; Kilpatrick y Col. 1982; Boarder y Col. 1982) y, uno solo, con la secuencia de la (Leu) encefalina (Ver tabla III y Fig. 7).

Por otro lado, el precursor Prodinorfina o Proencefalina B, da origen

a tres péptidos principales que contienen la secuencia de la (Leu) -  
encefalina: ( $\alpha$  /  $\beta$ -neoeendorfina, Dinorfina A-(1-8) / (1-17) y Dinor-  
fina B (Goldstein y Col. 1979, 1981; Kangawa y Col. 1981; Seizinger y  
Col. 1981, a,b; Fischli y Col. 1982; Kakidani y Col. 1982; Kilpatrick  
y Col. 1982; Suda y Col. 1982; Weber y Col. 1982) (ver Tabla III y -  
Fig. 7).

#### a) CONTROL DE LA BIOSINTESIS DE ENCEFALINAS

La evidencia experimental apoya la idea de que el control o modo de  
procesamiento del precursor de encefalinas es específico en cada teji-  
do. Así, el análisis de los productos peptídicos en la médula adrenal  
y tejido cerebral revelan diferencias significativas (Boarder y Col.  
1982). En la primera, la inmunorreactividad detectada para (Met) ence-  
falina y (Met)-Arg<sup>6</sup>-Fen<sup>7</sup> se encuentra mayoritariamente localizada en -  
componentes de alto peso molecular y, en menor proporción, en las for-  
mas de (Met) encefalina y (Met)-Arg<sup>6</sup>-Fen<sup>7</sup>. En contraste, en el tejido -  
cerebral se observa lo contrario, ya que aquí, la mayoría de la activi-  
dad inmunorreactiva para encefalina se localiza en las especies peptí-  
dicas (Met) encefalina, (Leu) encefalina, (Met)-Arg<sup>6</sup>-Fen<sup>7</sup> y (Met)-Arg<sup>6</sup>-  
Gli<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (Stern y Col. 1980; Boarder y Col. 1982). En vista de esto, se  
ha sugerido que el procesamiento de la Proencefalina A se lleva a cabo  
en forma más "completa" en el tejido cerebral que en el de la médula -  
adrenal. La explicación de tal hecho, se daría en la existencia de un  
procesamiento enzimático más completo del precursor en las especies -  
peptídicas encefalinérgicas en el tejido neuronal, ya que en éstas, se  
logra un tiempo de procesamiento más largo durante el transporte axonal  
de los gránulos de secreción hacia las terminales nerviosas, condición  
inexistente en la médula adrenal (Ikeda y Col. 1982).

#### b) INACTIVACION DE ENCEFALINAS: DEGRADACION ENZIMATICA

La comprensión de la regulación de los efectos de los péptidos opioides  
debe incluir también el conocimiento de los factores que determinan la  
duración de sus acciones. La terminación fisiológica de la acción de -

los transmisores conocidos se realiza ya sea removiéndolos del sitio - en que actúan (recaptura) y/o degradándolos para quitarles su eficacia (White y Col. 1985). A diferencia de la gran mayoría de los neurotransmisores no peptídicos, en donde el mecanismo principal involucrado en la remoción y terminación de sus acciones sinápticas radica en la - recaptura de alta afinidad por la terminal nerviosa una vez que han - sido liberados, los sistemas neuronales peptidérgicos, en general, no parecen poseer mecanismos funcionales de este tipo (Mckelvy, 1986). Sin embargo, algunos autores han reportado la existencia de mecanismos de recaptura dependientes de sodio y energía para carnosina (Abraham y Col. 1964), TRH (Pacheco y Col. 1981; Charli y Col. 1984) y sustancia P (Nakata y Col. 1981). Para las encefalinas, a pesar de existir reportes que postulan la existencia de procesos de recaptura análogos - (George y Van Loon, 1981; Roy y Col. 1982; Takeda y Col. 1982), la evidencia experimental acumulada parece indicar que son inactivadas por - medio de un proceso hidrolítico de tipo enzimático (Schwartz y Col. 1981).

Trabajando con el cuerpo estriado como sistema modelo rico en terminales encefalinérgicas se identificó una actividad enzimática que hidroliza la unión entre los aminoácidos -Gli<sup>3</sup>-Fen<sup>4</sup>- de la (Leu) encefalina y (Met) encefalina (Tir<sup>2</sup>-Gli<sup>2</sup>-Gli<sup>3</sup>-Fen<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>; Tir<sup>1</sup>-Gli<sup>2</sup>-Gli<sup>3</sup>-Fen<sup>4</sup>-Met<sup>5</sup>, respectivamente) (Malfroy y Col. 1978; Sullivan y Col. 1978). - Esta actividad fue denominada "encefalinasas" y se le caracterizó como una dipeptidil carboxipeptidasa asociada a membranas, altamente - específica (Km en el orden nanomolar) para estos dos pentapéptidos. Complementariamente, se ha demostrado una distribución nerviosa de la enzima en forma paralela a los sitios receptores de estos ligandos - opioides (Schwartz y Col. 1981). Así, los resultados anteriores sugieren que la enzima se encuentra localizada sobre las células encefalinoceptivas en el sitio receptor o en las propias terminales encefalinérgicas, representando en esta forma, un sustrato molecular participante en la terminación de las acciones de las encefalinas liberadas neuronalmente (Schwartz y Col. 1981).

A pesar de estos estudios, diversos autores han puesto en controversia la especificidad de esta actividad enzimática (Almenoff y Col. 1981; Blumberg y Col. 1981; Fulcher y Col. 1982; Hersh, 1982; Gafford y Col. 1983) al demostrar que la catálisis de la hidrólisis en la unión-Gli<sup>3</sup>-Fen<sup>4</sup>- de las encefalinas se puede deber a la acción de una zinc metalo-endopeptidasa asociada a membranas (Almenoff y Col. 1981), distinta a otra metalo-endopeptidasa (angiotensinasa) originalmente aislada en riñón y en fracciones sinaptosomales de corteza cerebral y núcleo caudado (Yang y Neff, 1972; Matsas y Col. 1983), ya que la distribución regional de la actividad de la última enzima no se correlaciona en forma paralela con la de los receptores a opioides (Benuck y Marks, 1980; Schwartz y Col. 1981).

En contraposición a todos estos datos experimentales, dos líneas de evidencia parecen no apoyar la idea de la actividad exclusiva de la "encefalinasa" asociada a membrana como elemento de inactivación y regulación de la acción de las encefalinas. La primera de éstas, se basa en la demostración de la participación de aminopeptidasas, en proporción importante, en la degradación de estos péptidos a través de la hidrólisis de la unión peptídica Tir<sup>1</sup>-Gli<sup>2</sup> (De Lorenzo, 1982; De la Baume y Col. 1983). Esta actividad, a diferencia de la descrita en el modelo de la "encefalinasa", se ha encontrado asociada a fracciones particuladas (membranas) y solubles (sobrenadante), la última probablemente producida por un mecanismo de liberación. En vista de esto, se ha propuesto que esta actividad representa un mecanismo fisiológico relevante en la regulación de los niveles de encefalina en el sistema nervioso (Hersh, 1982).

La segunda línea de evidencia se encuentra apoyada en la demostración de la liberación de peptidasas en cultivos de células gliales (Horsthemke y Col. 1983). Estos datos, han planteado la posible existencia de un mecanismo alternativo (no neuronal) en la regulación de la terminación de las acciones sinápticas de los neuropéptidos; sin embargo, en el catabolismo de las encefalinas todavía no se ha demostrado su participación (White y Col. 1985).

### 3). LOCALIZACION NEURONAL DE LAS ENCEFALINAS

#### a). DISTRIBUCION SUBCELULAR

Estudios de fraccionamiento subcelular y de radioinmunoensayo (RIA) - han demostrado que la inmunorreactividad encefalinérgica se encuentra predominantemente concentrada en las terminales nerviosas de la fracción sinaptosomal (Simantov, 1976). En apoyo a estos resultados, otros autores han logrado demostrar, por medio de inmunohistoquímica y - microscopía electrónica, la localización de las encefalinas en vesículas sinápticas (Pelletier y LeClerc, 1979; Pickel y Col. 1979, 1980).

#### b). DISTRIBUCION TISULAR

Diversos enfoques experimentales, combinando técnicas de bioensayos y/o radioinmunoensayo con algún tipo de microdissección de áreas cerebrales discretas (Glowinski y Iversen, 1966) han postulado la distribución diferencial de las encefalinas en el sistema nervioso central (Miller y Col. 1978; Yang y Col. 1978; Bayón y Col. 1980). En estos estudios, la concentración del pentapéptido (Met) encefalina se encuentra invariablemente más alta que la de (Leu) encefalina. La posible explicación de este hallazgo radica en el hecho de que el precursor de encefalinas (proencefalina A) tiene la secuencia de ambos péptidos en una proporción que favorece a la (Met) encefalina - (Hughes, 1983) (ver Fig. 7B).

Como se puede ver en la Tabla IV, la concentración más alta de encefalinas en el sistema nervioso se encuentra en el cuerpo estriado. - Dentro de éste, el globus pallidus posee una concentración significativamente mayor que el caudo-putamen. En adición a estos resultados, Cesselin y Col. (1981) han reportado una distribución asimétrica del contenido palidal de encefalina, con cantidades significativamente mayores hacia la porción anterior con respecto a la posterior. Por otro lado, las concentraciones más bajas se obtienen en el cerebelo y corteza cerebral.

- de la Tabla. (modificada)

de Cuello, A.C. In: Opioid Peptides. Br. Med. Bull. pp, 11-16, 1983).

	(Met) encefalina <sup>1</sup> (pmol/mg proteína)	(Leu) encefalina <sup>1</sup> (pmol/mg proteína)	(Met) encefalina <sup>2</sup> (pmol/mg proteína)	(Met) encefalina <sup>3</sup> (pmol/mg proteína)	(Leu) encefalina <sup>3</sup> (pmol/mg proteína)
Cerebro Total	0.88 ± 0.1	0.21 ± 0.06			
Cuerpo Estriado	5.90 ± 0.7	0.62 ± 0.03			
Caudo Putamen			17.5 ± 2.1		
Globus Pallidus			133 ± 28	47.81 ± 5.41	8.24 ± 0.93
Hipotálamo	5.42 ± 0.4	0.40 ± 0.07			
Cerebro Medio	1.90 ± 0.1	0.21 ± 0.01			
Médula y Puente			4.36 ± 0.9 (Médula)		
Hipocampo	0.91 ± 0.01	0.06 ± 0.01	1.12 ± 0.2		
Corteza	0.62 ± 0.004	0.44 ± 0.02	1.71 ± 0.2		
Cerebelo	0.01	0.01	0.82 ± 0.08		
Bulbo Olfatorio			2.27 ± 0.2		
Tubérculo Olfatorio			3.49 ± 0.5		
Septum			4.7 ± 0.45		
Núcleo Acumbens	6.1 ± 0.9	0.66 ± 0.07	17.5 ± 2.8		

Datos obtenidos por Radioinmunoensayo de extractos de regiones disectadas del sistema nervioso central por: (1) Miller y Col. (1978); (2) Yang y Col. (1978); (3) Bayón y Col. (1983).



Complementariamente, los resultados inmunocitoquímicos han mostrado -- concordancia con los estudios de cuantificación tisular por radioin-  
munoensayo de las encefalinas (Rossier y Col. 1977; Yang y Col. 1977; Hughes y Col. 1977). En el sistema nervioso, las encefalinas se --  
encuentran distribuídas en múltiples sistemas neuronales centrales y periféricos (Ver Fig. 8), así como también en las células cromafines de la médula adrenal. El sistema neuronal inmunorreactivo a encefalina más conspicuo en el sistema nervioso central de mamíferos --  
incluyendo humanos - se encuentra presente en el cuerpo estriado. Los cuerpos celulares se localizan en el caudo-putamen y proyectan abundantes fibras nerviosas que irradian topográficamente en forma --  
concéntrica hacia el globus pallidus (Elde y Col. 1976; Hökfelt y Col. 1977; Pollard y Col. 1977; Cuello y Paxinos, 1978; Pickel y Col. 1980; Del Fiacco y Col. 1982; Somogyi y Col. 1982) (posiblemente, algunas de estas neuronas envían también proyecciones hacia la sustancia nigra) (Cuello y Paxinos, 1978; Del Fiacco y Col. 1982). En esta forma, el --  
globus pallidus es la región cerebral que exhibe la densidad más alta de terminales encefalinérgicas.

En el complejo amigdalino se ha demostrado la existencia de otro sistema encefalinérgico importante, con somas neuronales que envían --  
proyecciones al núcleo intersticial de la estría terminal, a través --  
de ésta última (sistema que parece tomar parte en los mecanismos que regulan la conducta emocional) (Uhl y Col. 1978). En el hipotálamo, existen neuronas encefalinérgicas directamente asociadas a funciones neuroendocrinas. En las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico que envían axones al lóbulo neural (neurohipófisis), donde liberan ocitocina y vasopresina, se ha demostrado que las encefalinas son co-liberadas con estos péptidos ejerciendo un efecto modulador en la --  
liberación de vasopresina (Iversen y Col. 1980 a,b; White y Col. 1985). Ya que los dos péptidos son liberados de la misma terminal, las encefalinas pudieran ejercer su acción a través de alguna clase de autorregulación presináptica en estas terminales nerviosas (Iversen y Col. 1980 a,b). Por otro lado, diversas neuronas hipotalámicas (ejem. --  
núcleo arcuato) son responsables de la inervación encefalinérgica de

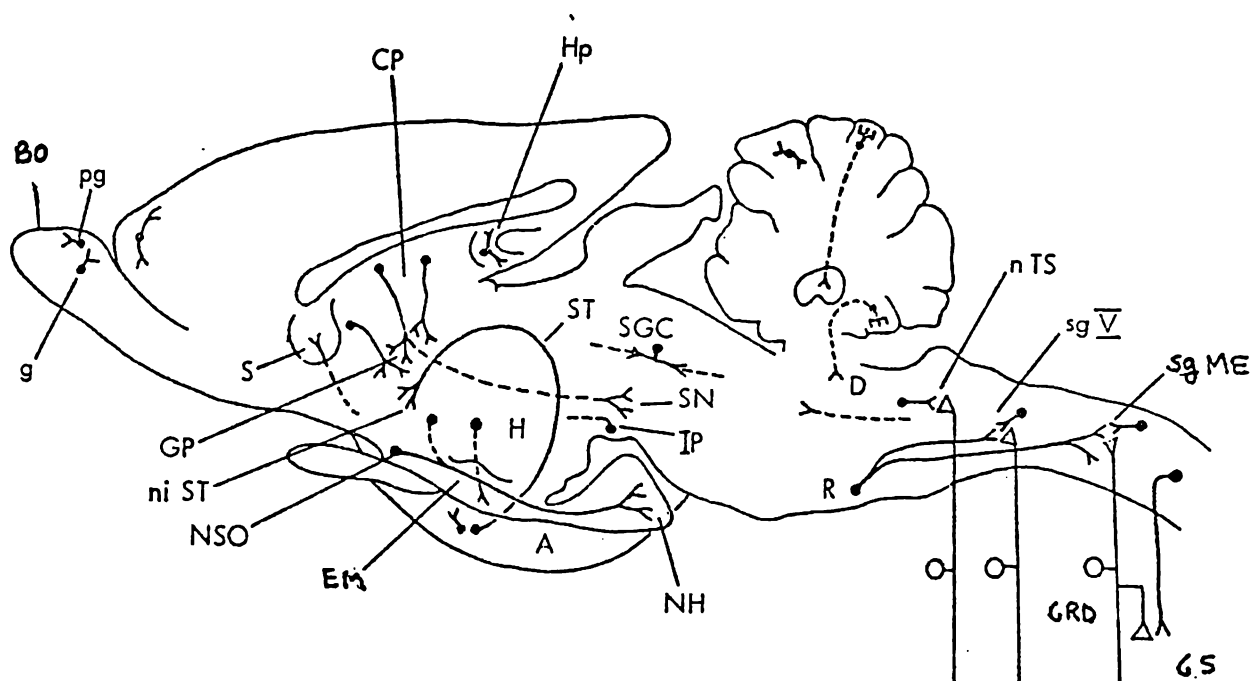


Fig. 3. Vista sagital del SNC de la ratona. Representación gráfica de los principales sistemas neuronales conformados por somas y fibras nerviosas inmunorreactivas a encefalina. BO: bulbo olfatorio; S: Septum; CP: Caudoputamen; GP: Globus Pallidus; HP: hipocampo; niST: Núcleo Intersticial de la estría terminal; ST: estría terminal; NSO: núcleo supraóptico; EM: eminencia media; NH: neurohipófisis; H: hipotálamo; A: amígdala; IP: núcleo interpeduncular; SN: sustancia nigra; SGC: sustancia gris central del cerebro medio (sustancia gris periacueductual); D: núcleo de Deiters; R: núcleo caudal del sistema del raphé (pallidus obscurus y magnus); nTS: núcleo del tracto solitario; sgV: sustancia gelatinosa del nervio trigeminal; sgME: sustancia gelatinosa de la médula espinal; GRD: ganglio de la raíz dorsal; GS: ganglio simpático. Los sistemas neuronales mejor establecidos son denotados por líneas sólidas. Las líneas punteadas indican vías neuronales que no han sido completamente confirmadas. Los puntos oscuros indican la presencia de somas neuronales encefalinérgicas. (Modificada de Cuello, A.C. In: Opioid Peptides. Br. Med. Bull. pp. 11-16, 1983).

la eminencia media, área que representa la vía final de liberación sanguínea portal de las hormonas hipotálamo-hipofisiotróficas. Este sistema encefalinérgico probablemente se encuentra asociado al control de la secreción de hormonas hipotalámicas a través de interacciones axo-axonales (Negro-Vilar, 1982).

En el tallo cerebral, neuronas encefalinérgicas del núcleo del raphé (en particular el magnus) envían proyecciones al cuerno ventral de la médula espinal y a las capas superficiales del cuerno dorsal y núcleo espinal del nervio trigeminal (Hökfelt y Col. 1977, 1979). En estas áreas, se ha logrado también identificar la presencia de una gran variedad de neuronas encefalinérgicas que forman circuitos locales, principalmente en las áreas de proyección central de las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (ver Fig. 8; los cuerpos celulares se representan por círculos abiertos y sus terminales nerviosas por triángulos abiertos). Asimismo, también se encuentran neuronas propioespinales encefalinérgicas del cuerno intermedio lateral de la médula espinal, que proyectan sus fibras hacia las ramas colaterales de las neuronas sensoriales de los ganglios simpáticos (Glazer y Basbaum, 1981). El estudio de estas áreas de proyección encefalinérgica hacia estructuras neuronales que manejan información sensorial primaria de tipo nociceptiva, ha despertado gran interés desde el punto de vista fisiológico, por las históricamente conocidas propiedades analgésicas de los opiáceos. Diversas evidencias experimentales han demostrado que la morfina y algunos opioides endógenos, son capaces de deprimir la actividad eléctrica inducida por estímulos nociceptivos en estas estructuras sensoriales (Le Bars y Col. 1976; Andersen y Col. 1978; Duggan y Col. 1977; Randic y Miletic, 1978).

En el cerebelo, algunos autores han demostrado la presencia de sistemas encefalinérgicos formados por células de Golgi y Purkinje (Finley y Col. 1981; Chan-Palay y Palay, 1982). Estas últimas, envían proyecciones nerviosas hacia el núcleo de Deiters, donde se ha sugerido la posible co-liberación de encefalinas y GABA. El significado funcional de este fenómeno es aún oscuro. Sin embargo, Chan-Palay y colaboradores

(1982) sugieren la posible existencia de un mecanismo de modulación de la acción GABAérgica, dependiente de encefalinas, sobre las neuronas de este núcleo.

#### 4). LIBERACION DE ENCEFALINAS

Desde los estudios de identificación, aislamiento y caracterización de las encefalinas en el sistema nervioso, así como la demostración de la presencia de estos péptidos en elementos celulares (sombras, fibras y terminales nerviosas) y subcelulares (vesículas sinápticas), se ha puesto en consideración su posible función neurotransmisora. Una de las líneas experimentales que han permitido consolidar tal papel fisiológico se ha basado en la demostración de su neurosecreción bajo condiciones de estimulación apropiadas en diversas preparaciones de tejido nervioso. En tal sentido, el cuerpo estriado (anatónicamente conformado por el núcleo caudado, putamen y globus pallidus) ha sido uno de los sistemas neuronales "modelo" que han favorecido un avance considerable del conocimiento de los mecanismos implicados en la liberación de estas sustancias en el sistema nervioso central. Esto se debe a las siguientes características: a) exhibir uno de los más altos contenidos de encefalina en el sistema nervioso; b) segregación de elementos neurales encefalinérgicos; los cuerpos celulares se distribuyen exclusivamente en el caudo-putamen; sus fibras y terminales nerviosas en el globus pallidus. Esta disposición anatómica es la que ha facilitado el estudio de los mecanismos y la regulación de la liberación de encefalinas en el sistema nervioso central.

##### a). ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES EN EL ESTUDIO DE LA LIBERACION DE ENCEFALINAS.

Se han implementado diversos enfoques experimentales con el fin de estudiar la liberación de encefalinas en el sistema nervioso (Hughes, 1983); indirectamente, por medio de la estimulación eléctrica de áreas cerebrales implicadas en el control de la respuesta analgésica a estímulos nociceptivos (ejem. sustancia gris periacueductual); o

a través del bloqueo de esta respuesta por la administración de anti-sueros específicos o agentes farmacológicos (antagonistas) que evitan sus acciones biológicas al nivel de la interacción con sus sitios - receptores (Hughes, 1983). En forma directa, por medio de la cuantificación del contenido tisular (Sosa y Col. 1977; Hong y Col. 1978; Yang y Col. 1978; Urca y Col. 1981; Kumar y Col. 1982; Grossman y Rees, - 1983) o en líquidos corporales (ejem. líquido cefalorraquídeo) de estos péptidos, antes y después de la aplicación de la estimulación - (Sjölund y Col. 1977; Akil y Col. 1978; Viveros y Col. 1979; Cesselin y Col. 1980, 1982; Yaksh y Elde, 1980; Wilson y Col. 1980; Livett y Col. 1981; Kuraishi y Col. 1981). Todos estos estudios, sugirieron - fuertemente que las encefalinas pueden ser liberadas en respuesta a la aplicación de estímulos específicos (despolarización del tejido - neural por estímulo eléctrico o químico) o generales (estrés, dolor, etc.) en regiones nerviosas específicas (Hughes, 1983). Sin embargo, solo unos cuantos estudios han intentado medir directamente la liberación de encefalinas a partir de sistemas neurales específicos (ejem: cuerpo estriado) y, han sido estos, los que han facilitado el estudio de los mecanismos y la regulación de la liberación de dichos péptidos en el sistema nervioso central (Iversen y Col. 1978). Desde este punto de vista, el uso de procedimientos de perfusión de regiones aisladas (rebanadas de tejido) (Bayón y Col. 1978; Henderson y Col. 1978; - Iversen y Col. 1978; Linberg y Dahl, 1981; Osborne, 1978, 1980), terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) (Henderson y Col. 1978) o, de áreas discretas de tejido neural en el cerebro del animal vivo - (Bayón y Col. 1981, a,b,c; Cesselin y Col. 1981), han brindado un -- avance sustancial en el conocimiento de estos fenómenos.

Todas las evidencias experimentales parecen apoyar que las encefalinas son secretadas a través de un mecanismo análogo al de los péptidos - transmisores conocidos (White, 1985): la despolarización de la terminal nerviosa induce la entrada de  $Ca^{++}$  a su interior, promoviéndose, con esto, la exocitosis de las vesículas secretoras que los almacenan y, consecuentemente, su liberación hacia el espacio sináptico (White y Col. 1985).

b). LIBERACION DE ENCEFALINAS EN LOS GANGLIOS BASALES: REGULACION.  
POR OTROS SISTEMAS NEUROTRANSMISORES.

Los estudios iniciales sobre la liberación de encefalinas llevados a -  
cabo en perfusiones de rebanadas de globus pallidus (Bayón y Col. -  
1978; Iversen y Col. 1978) o de cuerpo estriado (Henderson y Col.1978;  
Osborne, 1978, 1980; Linderberg y Dahl, 1981) han demostrado que la -  
liberación de (Met) encefalina y (Leu) encefalina es dependiente de  
calcio y puede ser estimulada por altas concentraciones de potasio  
( 50mM), o por el despolarizante veratridina, tal como ocurre con la  
liberación de los transmisores peptídicos y no peptídicos descritos -  
en el sistema nervioso (la cantidad de (Met) encefalina liberada con  
respecto a la de (Leu) encefalina se corresponden con la proporción  
en la que estos péptidos son sintetizados en el tejido a partir de su  
precursor). Distinguen a esta liberación, tanto la altísima proporción -  
de la cantidad existente en el tejido que es liberada en cada exposi-  
ción a los agentes despolarizantes (10% del contenido total), como una  
constante y abundante salida de la encefalina del tejido en condicio-  
nes de "reposo" (no estimulación; aproximadamente el 0.2% del conteni-  
do total por minuto). A diferencia de otros neuropéptidos estudiados,  
tales como la  $\beta$ -endorfina (Fukata y Col. 1980) o somatostatina --  
(Iversen, 1978), el contenido total de encefalina en el tejido dismi-  
nuye marcadamente durante los primeros 40 minutos de perfusión --  
in vitro, con una pérdida de más del 60% del contenido inicial con -  
respecto a rebanadas control recién preparadas. Es de notarse que si  
este gasto ocurriera también en el tejido del animal vivo, la sínte-  
sis y el transporte hacia las terminales sinápticas encefalinérgicas  
debería de sucederse en un tiempo promedio menor a 40 minutos. En -  
contraposición a esta hipótesis, Sosa y Colaboradores (1977) y Yang  
y colaboradores (1978), marcando activamente in vivo las pozas de -  
almacenamiento de estos péptidos a través de la incorporación de --  
aminoácidos precursores radiactivos, han demostrado que el recambio  
de estos péptidos requiere constantes de tiempo significativamente -  
mayores. Bayón y colaboradores (1978) han propuesto la existencia de  
un factor de "escape" para explicar esta altísima pérdida del conteni-

do tisular durante la perfusión de regiones aisladas de tejido nervioso.

En extensión a los estudios sobre regiones aisladas de tejido neural, otros autores han hecho uso de preparaciones in vivo (mediante sistemas de perfusión intracerebral con cánulas de infusión y extracción de líquido), en donde se ha podido estudiar la liberación de encefalinas en el estriado y globus pallidus, preservando sus relaciones anatómicas y fisiológicas con el resto del cerebro del animal vivo. Bayón y colaboradores (1981), estudiando la liberación in vivo de (Leu) encefalina en el globus pallidus del gato y la rata en libertad de movimiento, han demostrado que la liberación "espontánea" de este péptido puede ser aumentada significativamente por la despolarización local del tejido con 50 mM de potasio y, al menos, mostrar una dependencia parcial del incremento a la presencia de calcio en el medio de perfusión. Colateralmente, este mismo autor (Bayón y Col. 1981) reportó también un fenómeno similar en esta estructura por el tratamiento despolarizante local con la administración de veratrina o como consecuencia de la estimulación eléctrica del núcleo caudado ipsilateral.

En el núcleo caudado y el globus pallidus del cerebro del gato anestesiado se ha establecido un correlato entre la distribución regional de (Met) encefalina y la magnitud de su liberación "espontánea", y estimulada (Cesselin y Col. 1981). Así, se demostró que los niveles del péptido liberado en ambas circunstancias experimentales son de mayor magnitud en sus porciones ventrales, donde también se obtuvieron los valores más altos del contenido tisular de esta encefalina. Concomitantemente, el análisis comparativo de la tasa de liberación "espontánea" y estimulada del péptido en ambas regiones, reveló un valor significativo más alto para el globus pallidus. En esta región, la aplicación local de los agentes despolarizantes veratridina o batracotoxina produce un ostensible incremento en la liberación "espontánea" de (Met) encefalina. Este efecto es abolido por la administración simultánea del bloqueador del canal de sodio tetrodotoxina (Cesselin y Col. 1981).

En todas las condiciones experimentales anteriormente expuestas, se ha demostrado que la tasa de liberación in vivo (tanto en "reposo" como estimulada) de encefalinas en el globus pallidus es al menos de diez (Bayón y Col. 1981a) a cien veces menor (Cesselin y Col. 1981) que la observada en preparaciones in vitro con rebanadas de esta estructura (Bayón y Col. 1978); Iversen y Col. 1978). Esto sugiere una estabilidad mayor de la encefalina almacenada intracelularmente en el tejido no rebanado (Bayón y Col. 1981a). Diversas evidencias experimentales parecen apoyar la existencia de un mecanismo de control inhibitorio tónico sobre la liberación de encefalinas en el globus pallidus, -- dependiente del GABA, el cual sería solamente preservado en las preparaciones in vivo (Bayón y Col. 1978, 1981, a, b y c; Burgoin y Col. 1982; Herz y Col. 1980).

#### REGULACION DE LA LIBERACION DE ENCEFALINAS EN LOS GANGLIOS BASALES

Poca es la información disponible alrededor del control de la liberación de las encefalinas en estas estructuras subcorticales. En algunos estudios se ha intentado determinar si estos transmisores peptídicos (como en el caso de transmisores "clásicos" de naturaleza no peptídica, ejem. GABA) son capaces de modular su propia liberación, directa o indirectamente, a nivel presináptico (autorregulación - negativa). Desde el punto de vista farmacológico, la información - experimental parece ser contradictoria. En dos trabajos, se ha fallado en detectar algún efecto del agonista opiáceo morfina y del antagonista naloxona sobre la liberación estimulada de encefalina por alta - concentración de potasio (50mM) en preparaciones de rebanadas estriatales de la rata (Ritcher y Col. 1979; Osborne y Herz, 1980). En contraste a dichos resultados, Sawynok y colaboradores (1980) reportaron un efecto contrario de estos compuestos en la misma preparación del tejido, solo con procedimientos despolarizantes moderados (30 mM K<sup>+</sup>), pero no con intentos enérgicos (50 mM K<sup>+</sup>). Estas observaciones son consistentes con los reportes de otros autores, en los que se sugiere que la modulación presináptica de la liberación de transmisores puede demostrarse solamente cuando el estímulo no facilita una liberación masiva de transmisor (Arbilla y Langer, 1979).



En cuanto a la regulación de la liberación de las encefalinas por otros agentes neurotransmisores de estas estructuras basales, escasa es también la información de la que se dispone experimentalmente. Sin embargo, diversos estudios han investigado las relaciones de los sistemas GABAérgicos en el control de la función encefalinérgica estriatal. Como ya se revisó anteriormente en el capítulo de GABA y este mismo, el GABA y las encefalinas se encuentran en altas concentraciones en el estriado y el globus pallidus de los mamíferos, en donde se les ha asignado funciones transmisoras. En preparaciones in vitro e in vivo, ambas sustancias son liberadas de estos tejidos bajo condiciones control ( liberación "espontánea", no estimulada) o despolarizantes y producen efectos electrofisiológicos inhibitorios. Desde un punto de vista histológico, estos transmisores se encuentran contenidos individualmente en sistemas neuronales que forman vías de proyección (eferencias) o circuitos de inervación local (interneuronas). En extensión a este cuerpo de información, algunos trabajos han reportado la coexistencia de ambas sustancias en una misma subpoblación neuronal del estriado ( Oertel y Col. 1983 y 1984; Aronin y Col. 1984 ; Zahm y Col. 1985). Desde un punto de vista morfológico, no disponemos de suficientes evidencias estructurales que permitan establecer la interrelación directa entre los dos sistemas transmisores mediante la formación de algún tipo de contacto sináptico (Oertel y Mugnaini,1984). No obstante esto, una línea sólida de resultados derivados de estudios farmacológicos llevados a cabo en preparaciones in vitro e in vivo de tejido estriatal, sugieren la existencia de interrelaciones funcionales complejas entre la transmisión GABAérgica y encefalinérgica a este nivel.

Actualmente, la información farmacológica disponible parece plantear la existencia de acciones antagónicas del GABA sobre la regulación de la liberación de encefalinas. En una línea de estudios, se ha sugerido una función regulatoria inhibidora sobre la liberación de estos péptidos ; en otra, por el contrario, la evidencia experimental parece asignarle efectos facilitatorios. En base a lo anterior, se ha planteado la existencia de dos sitios receptores farmacológicamente dis-

tingüibles, a través de los cuales este aminoácido pudiera ejercer tales acciones sinápticas opuestas. En vista de esto, a continuación revisaremos en uno u otro sentido, los trabajos más relevantes con respecto a los aspectos funcionales regulatorios de la transmisión GABAérgica sobre la transmisión encefalinérgica estriatal.

Con la aplicación de la técnica de perfusión intracerebral in vivo (push-pull), Burgoin y colaboradores (1982) estudiaron la modulación de la liberación in vivo de (Met)encefalina mediante la administración de GABA y sustancias con actividad GABAérgica en el globus pallidus del gato anestesiado. Estos autores reportaron una reducción inmediata y sostenida de la liberación "espontánea" de este péptido por la aplicación local de GABA. La magnitud del efecto se correlacionó directamente a la dosis adicionada del aminoácido (10-500mM). Un fenómeno similar se obtuvo también con la administración de la benzodiazepina diazepam (facilitador de la transmisión GABAérgica), pero no por el agonista muscimol. Por el contrario, los estudios de antagonismo farmacológico revelaron una acción facilitadora para la bicuculina, e inhibitoria para picrotoxina. Ya que las encefalinas se encuentran contenidas en gran cantidad en las terminales de las neuronas encefalinérgicas de la vía estriado-palidal, el argumento más simple para explicar los cambios inducidos en la liberación de la (Met)encefalina por la aplicación de GABA y sus compuestos relacionados en el globus pallidus, según los autores, se encontraría al nivel de la existencia de un mecanismo de regulación presináptica tónico inhibitorio, dependiente de GABA. Sin embargo, las acciones farmacológicas de este aminoácido, sus agonistas y antagonistas, parecen apoyar la mediación de estos efectos a través de más de un tipo de sitio receptor (Burgoin y Col. 1982).

Desde un punto de vista conductual, este fenómeno regulatorio podría contribuir a papeles funcionales opuestos de las neuronas GABAérgicas y encefalinérgicas en el globus pallidus. En este contexto, se ha visto que la inyección intrapalidal de agonistas sintéticos de encefalinas producen un aumento de la actividad locomotriz en la rata, el cual es antagonizado en presencia de naloxona (Joyce y Col. 1981). Por

otro lado, la facilitación farmacológica de la neurotransmisión GABAérgica palidial se asocia a catalepsia (Pycock y Col. 1976).

En preparaciones de perfusión in vitro con rebanadas de cuerpo estriado (el cual incluye al globus pallidus), se ha reportado, también, efectos contradictorios sobre la regulación de la liberación de encefalinas mediante la manipulación farmacológica de la transmisión GABAérgica local. Harsing y colaboradores (1982), han investigado los efectos de la benzodiacepinas como facilitadores de la transmisión GABAérgica sobre la modulación de la liberación de las encefalinas en rebanadas del cuerpo estriado de rata. Estos autores encontraron que el diazepam y flunitrazepam inhiben, en forma dependiente de la dosis, la liberación estimulada de (Met) encefalina por despolarización con alto potasio (47mM), sin afectar su tasa de liberación "espontánea". Un efecto similar es observado por el tratamiento con los agonistas muscimol y THIP. Todos estos efectos son antagonizados por la aplicación simultánea de picrotoxina en el medio de perfusión, y, adicionalmente en el caso de las benzodiacepinas, como consecuencia del "agotamiento" del contenido endógeno de GABA tisular por el inhibidor de la GAD, isoniazida. A la luz de estos resultados, los autores sugieren que las acciones de las benzodiacepinas requieren de la preservación de los niveles de GABA almacenado tisularmente y de la disponibilidad de receptores GABAérgicos. Por el contrario, la acción de los GABA miméticos, requiere solo de la disponibilidad de estos últimos, y es independiente de la cantidad de GABA presente en las terminales nerviosas.

En contraste a todos los hallazgos antes mencionados, Sawynok y Labella (1981) han reportado efectos opuestos sobre la modulación farmacológica GABAérgica de la liberación de encefalinas en la misma preparación de tejido nervioso. En sus resultados, ellos encontraron que la aplicación exógena de GABA potencia la liberación estimulada de (Met) encefalina cuando ésta se induce por la despolarización con 30mM de potasio, pero no por 50mM. Este efecto es dependiente de la dosis (10-100mM) del agente despolarizante, y no afecta la tasa de liberación "espontánea" del péptido. Adicionalmente, el agonista baclofen pero no el mus-

cimol reproduce los efectos del GABA y, la picrotoxina, pero no bicuculina, bloquea los efectos de potenciación del GABA y baclofen. También, ninguno de los antagonistas bloquea por sí mismo la liberación estimulada o "espontánea" de (Met)encefalina cuando se aplican individualmente. En extensión a estos resultados, con el mismo modelo experimental de trabajo, Osborne y Herz (1980) demostraron acciones farmacológicas análogas de estas sustancias sobre la liberación de (Met)encefalina.

El mecanismo mediante el cual el GABA potencia la liberación estimulada de (Met)encefalina no es claro a la fecha actual. Sin embargo, se ha visto que este aminoácido es capaz de despolarizar terminales nerviosas en rebanadas de cerebro, efecto que es bloqueado solo por picrotoxina (Simmonds, 1980). Así, es posible que tal despolarización pudiera ser aditiva a la producida por la estimulación submáxima con concentraciones moderadas de potasio (ejem. 30mM). Adicionalmente, algunos autores (Sawynok y Labella, 1981) proponen que el efecto facilitador del GABA y baclofen sobre la liberación estimulada de (Met)encefalina sería mediado por el sitio receptor GABAérgico B, recientemente caracterizado farmacológicamente por Bowerly y colaboradores (1979 a), el cual es activado por baclofen y no por muscimol y, únicamente, sensible al bloqueo con picrotoxina.

Con otro tipo de enfoques experimentales, algunos autores también sugieren la existencia de un efecto facilitador de la liberación de encefalinas dependiente de GABA. En la rata, la elevación de los niveles de GABA endógeno cerebral mediante la administración sistémica in vivo de dosis repetitivas de inhibidores de la GABA-T (ácido amino-oxiacético y gabaculina), inducen una disminución significativa del contenido estriatal de (Met)encefalina y un aumento reactivo de su síntesis (Sivam y Hong, 1986). El mecanismo responsable del decremento parece radicar en una liberación abundante y sostenida del péptido durante el tratamiento, exclusivo de esta región cerebral, ya que el efecto no es observado en otras áreas del sistema nervioso central (tales como el hipotálamo, hipocampo, corteza frontal, tallo cerebral y médula espinal). En complemento a estos resultados, Duka y

colaboradores (1979 y 1980) y Harsing y colaboradores (1982) reportaron un fenómeno análogo sobre los niveles estriatales de (Met)encefalina por el tratamiento con el ácido aminooxiacético. En resumen, todos los antecedentes mencionados sugieren la existencia de interrelaciones complejas de la transmisión GABAérgica y encefalinérgica estriatal mediante mecanismos modulatorios recíprocos aún no bien comprendidos. Desde tal punto de vista, es necesario abordar su estudio en modelos experimentales integrativos, que permitan esclarecer sus papeles funcionales en la regulación de la fisiología nerviosa y, en última instancia, en el control de aspectos conductuales del animal vivo (ver sección de resultados de la tesis).

## 5.- ACCIONES SINAPTICAS DE LAS ENCEFALINAS

### a). PRESINAPTICAS

Muchos investigadores han encontrado que las encefalinas inhiben el disparo neuronal (Bloom y Col. 1981). En el hipocampo, una de las regiones en donde las encefalinas inducen el disparo neuronal, existe la evidencia de que tal fenómeno es debido a la inhibición del disparo de neuronas de tipo inhibitorio (Zieglgänsberger y Col. 1979). Un fenómeno similar de "desinhibición" parece ocurrir en las sinapsis dendro-dendríticas de las células mitrales del bulbo olfatorio (Nicolli y Col. 1980 a y b). Desde el punto de vista bioquímico, en diversas regiones neurales las encefalinas inhiben la liberación de neurotransmisores, tales como sustancia P (Jessel y Iversen, 1977; Fields y Col. 1980), vasopresina (Gudelsky y Porter, 1979; Martin y Voight, 1981), dopamina (North y Tonini, 1979), acetilcolina (Sheppard y Col. 1979) y somatostatina (Mudge y Col. 1979). Por lo tanto, uno de los puntos centrales en la investigación neurofisiológica ha sido la identificación del mecanismo iónico que pudiera explicar estas acciones inhibitorias. La dificultad de tal hecho radica en que no se conoce si el fenómeno inhibitorio se realiza a través de sinapsis axo-somáticas o axo-axónicas o, por medio de algún otro tipo de interacciones neurales. La capacidad para inhibir la liberación de sustancia P y vasopresina sugiere que la encefalina actúa directamente sobre las

terminales que contienen dichos péptidos, por lo que se ha propuesto la existencia de un mecanismo de control inhibitorio de tipo presináptico (Weiss, 1974; Konishi y Col. 1980; Matthews y Cuello, 1982; Negro-Villar, 1982). Mudge y colaboradores (1979), midiendo la corriente de calcio en terminales nerviosas de las neuronas del ganglio dorsal (las cuales utilizan sustancia P como transmisor) han demostrado un efecto inhibitorio en la conductancia del catión por la acción de la encefalina, el cual es revertido con naloxona (antagonista competidor de las encefalinas por su sitio receptor). Así, el efecto en la disminución de la entrada de calcio a la terminal nerviosa por las encefalinas podría explicar la inhibición de la liberación de sustancia P a este nivel. En apoyo a estos datos, otros autores han demostrado la inhibición de la captación de  $^{45}\text{Ca}$  por opiáceos en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) en condiciones de "reposo" (Guerro-Munoz, 1979 a y b) y de estimulación despolarizante (Ross, 1978).

Otro posible mecanismo de acción, se encuentra relacionado al hallazgo de que las encefalinas y los opiáceos actúan directamente sobre las neuronas del plexo mientérico intestinal, induciendo un decremento en su disparo, el cual es reversible por naloxona (Dingledine y Goldstein, 1976; Williams y Col. 1979). Existe la evidencia experimental de que este fenómeno pueda relacionarse a una hiperpolarización de la membrana (probablemente por el incremento en la conductancia al potasio o cloro en la terminal nerviosa afectada por las encefalinas) (Dingledine y Goldstein, 1976; Williams y Col. 1979). En base a estos hechos, North y colaboradores (1979) propusieron que el efecto hiperpolarizante de las encefalinas evita la propagación del potencial de acción que despolariza la terminal nerviosa.

#### b). POSTSINAPTICAS

Se ha sugerido también que las acciones de los opiáceos y opioides pueden ser mediadas en forma postsináptica. Existe la evidencia directa de que en el locus coeruleus las terminales encefalinérgicas establecen contactos sinápticos axo-somáticos o axo-dendríticos sobre las neuronas noradrenérgicas de este núcleo (Pickel y Col. 1979). Una

inhibición en el disparo de estas neuronas ha sido demostrada por la aplicación local de opiáceos y encefalinas, la cual es reversible a naloxona (Pepper y Henderson, 1980). Zieglgänsberger y Bayerl (1976 a y b) han demostrado efectos similares sobre neuronas propioespinales de la médula. El evento propuesto en todos los casos es la hiperpolarización postsináptica de las células, debido posiblemente al incremento en la conductancia al cloro o potasio, similar al sugerido en el plexo mientérico. Otro mecanismo de acción posible, se relaciona al hecho de que los agonistas opioides reducen las respuestas en el disparo a diversos transmisores excitatorios, tales como acetilcolina y glutamato. Ya que estos últimos actúan promoviendo un aumento en la conductancia del sodio hacia el interior de la célula nerviosa, Zieglgänsberger y Bayerl (1976 a) sugieren que la encefalina "paraliza" en alguna forma dicho mecanismo de transporte.

D) LAS PROTEINAS (Y ENZIMAS) COMO POSIBLES AGENTES MENSAJEROS QUIMICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO.

a) GENERALIDADES

La estimulación del tejido nervioso, además de inducir la liberación de neurotransmisores putativos de naturaleza peptídica (ejem. encefalinas) y no peptídicos (aminoácidos y aminos biogénicas), induce la liberación de otras sustancias aún poco caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y fisiológico. Dentro de éstas, se encuentran materiales de alto peso molecular que se pueden detectar con reactivos usados tradicionalmente en la determinación de proteínas. Desde este punto de vista, se ha creado la necesidad de implementar estrategias que permitan estudiar su liberación bajo condiciones específicas de estimulación, con el objeto de lograr su identificación, aislamiento y -- caracterización química y, así, estudiar sus posibles funciones dentro de la fisiología nerviosa (Bayón y Col. 1985; Greenfield y Shaw, 1982; Greenfield y Col. 1984).

El estudio de la liberación de proteínas de células nerviosas tiene -- como antecedente el descubrimiento de la liberación simultánea de -- catecolaminas y proteínas de células cromafines de la médula adrenal. Cuando se evoca la liberación de catecolaminas, mediante la administración de acetilcolina, componentes protéicos de alto peso molecular que se encuentran almacenados en los gránulos cromafines son liberados mediante un proceso de exocitosis (Banks y Col. 1965; Kirshner y Col. 1967). Entre dichas proteínas de alto peso molecular se encuentran las llamadas cromograninas, un grupo heterogéneo de proteínas de las cuales la más abundante es la cromogranina A (Schneider y Col. 1967) y la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, enzima que participa en la síntesis de catecolaminas (Viveros y Col. 1968).

Estudios subsecuentes realizados por De Potter y Col. (1969 a), demostraron que en las sinapsis adrenérgicas, la liberación inducida por -- estimulación eléctrica del neurotransmisor norepinefrina, es acompañada por la liberación de cromograninas y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa y es dependiente de la presencia de calcio en el medio de incubación. Reportes --



ulteriores, han confirmado que las cromograninas y la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa están localizadas junto con la norepinefrina en las vesículas "grandes" de las terminales adrenérgicas y que su liberación es correlativa con la de norepinefrina (Cubeddu y Col. 1974; Geffen y Col. 1970; Gewirtz y Kopin, 1970; Smith y Col. 1970; Weinshilboum y Col. 1971). Asimismo, la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa ha sido encontrada también en el líquido cefalorraquídeo de humanos (Goldstein, 1976) y de conejos, donde su concentración aumenta con la estimulación de nervios periféricos (ciáticos) (De Potter, 1976).

Dentro de este contexto y de manera independiente a los estudios de secreción de las cromograninas y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa en la médula adrenal y nervios periféricos, se reportó la secreción inducida por estimulación de proteínas glucosiladas en cultivo de tejido de paratiroides de la rata (Licata y Col. 1972) y su dependencia de la presencia de calcio en el medio de incubación (Kemper y Col. 1974; Morrisey y Cohn, 1978). Aunado a esto, también se logró determinar que entre las especies secretadas existen por lo menos dos distintas, denominadas proteína secretora I y Proteína secretora II, la primera representada por dos isoformas (Morrisey y Col, 1978, 1980). Recientemente, la Proteína secretora I ha sido purificada y parcialmente caracterizada, reportándose que es similar a la cromogranina A en su composición de aminoácidos y carbohidratos, secuencia parcial de aminoácidos, reactividad inmunológica cruzada y propiedades físico-químicas, con lo cual se ha concluido que se trata muy probablemente de la misma proteína (Cohn y Col. 1981; Cohn y Elting, 1983). Adicionalmente, esta proteína se ha localizado (empleando anticuerpos) en células de la tiroides, adenohipófisis, de los islotes pancreáticos, ganglio celíaco y mesentérico del antrum gástrico (Cohn y Col. 1984).

Por otro lado, existen varios trabajos en los que se reporta la liberación de proteínas que no han sido identificadas, las cuales son liberadas como respuesta a un estímulo. Hacia 1960, se publicó un trabajo en el que se observa el aumento de una enzima no identificada con actividad proteolítica en el líquido cefalorraquídeo del cerebro del gato,

al estimular eléctricamente el cerebro o el nervio ciático (Chapman y Col. 1960). La enzima liberada se midió por su actividad proteolítica que produce un polipéptido vasodilatador al actuar sobre la globulina del plasma.

En 1975, Kaczmarek y Adey publicaron un trabajo en el que se observó en perfusados de corteza cerebral de gatos la liberación de proteínas y glucoproteínas marcadas con radioisótopos (Kaczmarek y Adey, 1975). La liberación de estas proteínas se incrementó considerablemente con la aplicación de una solución que contenía una alta concentración de potasio (40mM).

Musick y Hubbard (1972), trabajando en una preparación de hemidiafragma-nervio frénico del ratón, han reportado la liberación de material protéico de las terminales nerviosas de la unión neuromuscular. Estudios subsecuentes en el mismo tipo de preparación, han demostrado que la estimulación eléctrica del nervio frénico produce un aumento en la liberación del material protéico correlacionable con un incremento de la liberación de acetilcolina en las terminales nerviosas del nervio - (Musick, 1979). Sin embargo, se ha sugerido que una porción importante del material protéico liberado es de origen muscular (Musick, 1975,1979).

Estudios en el sistema neurosecretor fotocerebral de la langosta (Friedel y Col. 1981) han identificado la liberación de material protéico - de los corpora cardiaca después de la propagación de un potencial de - acción. Esta liberación es dependiente de la entrada de calcio durante la despolarización.

En rebanadas de tejido del hipocampo de la rata, Duffy y colaboradores (1981) han reportado un aumento en la liberación de material protéico al líquido extracelular consecuente a la estimulación eléctrica del - tejido.

En cultivos de neuronas simpáticas, Sweadner (1981) ha demostrado la liberación de un grupo de glucoproteínas acídicas de alto peso molecular

al medio de cultivo, cuando se estimulan estas neuronas con extractos de veneno de la araña viuda negra para inducir la liberación de neurotransmisores. El patrón de proteínas liberadas por estimulación al medio de cultivo es diferente del patrón de proteínas liberadas en condiciones de "reposo". Estas proteínas sufren modificaciones postraduccionales (probablemente un corte proteolítico) antes de ser liberadas en la superficie de la membrana plasmática cuando este es el mecanismo de liberación (Sweadner, 1983a). Asimismo, su liberación es dependiente de la presencia de calcio en el medio de incubación. Estudios más detallados han revelado que dos de estas proteínas son liberadas al medio de cultivo como monómeros solubles (Sweadner, 1983b). En apoyo a los datos anteriores, Richter-Landsberg y colaboradores (1984) han reportado la liberación de glucoproteínas de membrana plasmática en cultivos de feocromocitoma de la línea celular PC12. Estas proteínas, parecen corresponder a las reportadas por Sweadner en cultivos de neuronas simpáticas y, una de ellas, parece derivar de una proteína integral de membrana previamente caracterizada, llamada glucoproteína NILE (proteína externa inducida por el factor de crecimiento nervioso) (McGuire y Col. 1978).

Experimentos de marcaje con aminoácidos radiactivos, han demostrado la liberación inducida de proteínas radiactivas en cultivos de tejido del lóbulo intermedio de la pituitaria del ratón por medio de despolarizaciones con altas concentraciones de potasio en presencia de calcio (Thorton, 1982). Con técnicas inmunoquímicas y de doble marcaje con aminoácidos radiactivos se reportó que dos proteínas del cerebro de la carpa dorada son secretadas al líquido extracelular (Shashoua, 1979). En experimentos similares realizados en el cerebro del pollo, se ha reportado que un grupo de proteínas que se marcan rápidamente son liberadas al líquido extracelular (Benowitz y Shashoua, 1979). En preparaciones de rebanadas de hipocampo de la rata, Hesse y colaboradores (1984) han demostrado la liberación "tónica" (no estimulada) de proteínas glucosiladas radiactivas, a través del empleo de doble marcaje con fucosa- $H^3$  y valina- $C^{14}$ .

En el sistema nervioso central de la rata, Shashoua y colaboradores (1984) han reportado la liberación de la proteína S-100 al líquido extracelular, mediante la extracción de éste, a partir de la incubación de rebanadas de hipocampo y cerebro total del animal en medio isotónico. Esta proteína ha demostrado ser característica del sistema nervioso central (Moore, 1973 y 1975) y se ha reportado su localización en el citoplasma de las células gliales (Moore, 1975), así como en la membrana de las terminales sinápticas (Rusca y Col. 1972; Haglid y Col. 1974; Donato y Col. 1975) y del núcleo neuronal (Haydén y McEwen, 1966). Su papel funcional es aún desconocido.

En 1976, Korr y colaboradores realizaron un estudio de marcaje radiactivo de neuronas vagales y del núcleo del hipogloso con aminoácidos que contenían  $^{14}\text{C}$ , observándose que las sustancias radiactivas viajaron a lo largo de los nervios y, después de varios días atravesaron la unión neuromuscular de la lengua (Korr y Col. 1967). Estudios subsecuentes del mismo grupo de trabajo con enfoques experimentales análogos, en los que se determinó la radiactividad del material protéico precipitable por TCA (ácido tricloroacético) proveniente de las células musculares marcadas, demostraron que las proteínas transportadas llegan al músculo estilogloso a intervalos de tiempo específicos después de su síntesis (Korr y Appeltauer, 1974). El análisis electroforético del material protéico transportado al músculo reveló que una de las proteínas aparece tanto en el nervio como en el músculo durante el primer día después del marcaje (Appeltauer y Korr, 1975 y 1977).

En perfusados obtenidos con cánulas "push-pull" en la formación reticular mesencefálica del cerebro del gato, se han reportado niveles altos de liberación de material protéico en relación a estados conductuales del animal (Drucker - Colín y Col. 1975); los niveles de proteína liberada cambian de manera cíclica y parecen ser mayores durante la fase MOR (movimiento ocular rápido) del sueño, en comparación con los niveles en estado de vigilia (Drucker-Colín y Spanis, 1975; Drucker-Colín y Gutierrez, 1976).

B) LIBERACION DE PROTEINAS Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LOS GANGLIOS BASALES.

En los últimos años, algunos investigadores han centrado su atención - en el estudio de la liberación de proteínas en diversas estructuras de los ganglios basales mediante la técnica de perfusión local in vivo de tejido nervioso con cánulas de infusión y extracción de líquido (push-pull).

Empleando esta técnica en una preparación de gato anestesiado con un - dispositivo de cuatro cánulas implantadas simultáneamente (dos en ambos núcleos caudados e igual número en las sustancias nigras), Greenfield y colaboradores (1983a) han reportado cambios complejos en la liberación del material protéico endógeno (MPE). Sus resultados muestran una liberación "espontánea" del MPE en el núcleo caudado y en la sustancia nigra. En esta última estructura, la despolarización local por la elevación de la concentración de potasio en el medio de perfusión (30 mM), aumentó significativamente los niveles de liberación del MPE. Este - cambio no se acompañó de alguna modificación en la tasa de liberación "espontánea" del MPE en el núcleo caudado y la sustancia nigra contralaterales, respectivamente. En el análisis de la dependencia de calcio, se demostró que del total del MPE liberado por estimulación en la sustancia nigra, al menos el 30% es dependiente de la presencia del - catión en el medio de perfusión.

En otra serie de estudios los mismos autores han estudiado la liberación de cuatro proteínas específicas con actividad enzimática: aminopeptidasa, deshidrogenasa láctica (LDH), acetilcolinesterasa (AChE) y colinesterasa no específica (ChE). Los experimentos se llevaron a cabo en preparaciones de gato, rata o conejo anestesiados, con cánulas de infusión-extracción implantadas simultáneamente en el núcleo caudado y en la sustancia nigra. El objetivo de tales estudios se centró en - observar los efectos de la estimulación de la vía nigro-estriatal - dopaminérgica sobre la liberación de las cuatro especies de enzimas en la sustancia nigra y el núcleo caudado ipsilateral. En este contexto,

dos aspectos se analizaron: observación de los efectos de la manipulación despolarizante local por alto potasio sobre la liberación de las cuatro enzimas en la sustancia nigra y núcleo caudado; correlación de la liberación enzimática con la actividad del tracto nigro-estriatal dopaminérgico. El último planteamiento se abordó mediante el estudio de la modulación de la liberación enzimática en respuesta al tratamiento con el agonista dopaminérgico anfetamina o, en algunos casos, a través de la lesión química de la vía nigro-estriatal con la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A continuación resumiremos por separado la información concerniente a los estudios en cada una de las enzimas antes mencionadas.

Liberación de aminopeptidasas.- La sustancia nigra y el núcleo caudado muestran un alto contenido de péptidos neuroactivos (Emson, 1979) y aminopeptidasas (Shaw, 1978). Sin embargo, una alta porción de este grupo de enzimas se encuentra asociada, no solo a neuronas, sino que también a las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Shaw, 1978). En vista de tal hecho, se ha intentado dilucidar que población de este grupo de enzimas tiene un origen neuronal. Como estrategia de análisis, se ha intentado observar los cambios de concentración extracelular de la enzima en relación a la actividad nerviosa. Con este propósito, Greenfield y colaboradores (1983b) investigaron la posibilidad de la liberación in vivo de la actividad de aminopeptidasa en la sustancia nigra y el núcleo caudado del gato anestesiado, mediante la activación del sistema nigro-estriatal por la aplicación nigral de altas concentraciones de potasio.

En condiciones de "reposo" (no estimulación), los autores lograron detectar la presencia de una isoenzima de aminopeptidasa en los perfusados de ambas regiones subcorticales, con rápida movilidad electroforética en geles de acrilamida con SDS. En la sustancia nigra se observó un incremento en la liberación "espontánea" de dicha isoenzima (94% arriba del valor control promedio) como consecuencia de la despolarización con alto potasio. El efecto fue acompañado por una disminución simultánea del 26% de la tasa de liberación "espontánea" --

promedio de la iso especie en el núcleo caudado.

Los resultados con la lesión experimental del tracto nigro-estriatal - demostraron la desaparición del decremento en la liberación "espontánea" de la isoenzima en el caudado evocada por la administración nigral de potasio; mientras que, en la sustancia nigra, se reportó una reducción del 50% en la liberación "espontánea" y estimulada de la misma sustancia (Greenfield y Col. 1983b).

Con estos resultados, los autores concluyen que el 26% de la enzima liberada en el núcleo caudado muy probablemente tenga, como origen, las terminales nerviosas de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, o, de las mismas células intrínsecas de la estructura sobre las cuales estas terminales establecen sinapsis. Por otro lado, en la sustancia nigra, el 50% de la isoenzima sería derivada de las propias neuronas nigrales.

En otra línea de estudios, Greenfield y Shaw (1982) demostraron la facilitación de la liberación de otra isoenzima de aminopeptidasa, de escasa movilidad electroforética, la cual no se libera "espontáneamente" en la sustancia nigra, pero sí por la aplicación local de anfetamina y no como consecuencia de la despolarización con alto potasio - (Greenfield y Col. 1983 b). Estos resultados orientan a pensar que la liberación de esta iso especie sea regulada por "autorreceptores" - dopaminérgicos localizados en las propias células dopaminérgicas nigrales o, alternativamente, por receptores dopaminérgicos presinápticos de las terminales axónicas eferentes de esta estructura (Greenfield y Col. 1983b).

El hecho de que la forma de "rápida movilidad" electroforética de - aminopeptidasa sea liberada en forma espontánea y, en parte, que este proceso sea modificado por la despolarización y lesión de la vía nigro-estriatal dopaminérgica, hizo sugerir a Greenfield y colaboradores (1983b) que, al menos, una parte de la enzima liberada se encuentra - estrechamente relacionada a la tasa de disparo de las neuronas -

nigroestriatales. El significado funcional de tal fenómeno no es claro aún, más sin embargo, quizá una de las acciones extracelulares sea en la participación de la hidrólisis de péptidos con función transmisora a este nivel (Greenfield y Col. 1983b).

En otro contexto, a diferencia de la isoespecie antes mencionada, la liberación de la forma de "lenta" movilidad electroforética de la enzima parece no guardar relación a la actividad neuronal (no existe una liberación "espontánea" ni estimulada por alto potasio en el tejido). Aunque no se tiene conocimiento cabal de si esta isoenzima se origina a partir de las células nigroestriatales dopaminérgicas, su liberación se encuentra influenciada en alguna forma por la activación de los receptores dopaminérgicos y/o por cambios temporales relativamente largos en la disponibilidad de la dopamina en la sustancia nigra (la anfetamina facilita una elevación más efectiva de los niveles extracelulares de dopamina que la despolarización por el alto potasio) (Greenfield y Col. 1983b). En vista de esto, se le ha asignado a esta forma electroforética de aminopeptidasa una posible función neuromoduladora, probablemente no relacionada a la hidrólisis peptídica, con capacidades fisiológicas aún no exploradas a este nivel (Greenfield y Col. 1983b).

Liberación de deshidrogenasa láctica (LDH).- Esta enzima es conocida generalmente como una proteína citoplasmática soluble y tradicionalmente usada como "enzima de escape" y por lo tanto útil en el señalamiento "bioquímico" del daño tisular. Así, algunos autores (Greenfield y Col. 1980 y 1983b; Greenfield y Shaw, 1982) han empleado la medición de su actividad en perfusados de cerebro con el fin de registrar dos variables metodológicas durante la perfusión: el grado de lesión del tejido perfundido; contaminación plasmática del mismo a partir de la extravasación o ruptura de vasos sanguíneos. Sin embargo, la confiabilidad que ofrece la enzima como "marcador bioquímico" de daño tisular es objetable. Por un lado, en apoyo a su especificidad en el señalamiento del daño tisular, se ha demostrado que la activación de la vía nigro-estriatal dopaminérgica con la aplicación nigral de anfetamina no induce cambios sobre los niveles de deshidrogenasa láctica liberados en el perfusado en condiciones de "reposo" en esta estructura o en el



núcleo caudado ipsilateral (Greenfield y Shaw, 1982). Sin embargo, en contraposición a esta hipótesis, Greenfield y colaboradores (1983b) reportaron un aumento significativo en la tasa de liberación "espontánea" de la enzima en la sustancia nigra, bajo condiciones despolarizantes por la administración local de alto potasio y un decremento simultáneo de la cantidad liberada "espontáneamente" en el núcleo caudado ipsilateral.

En extensión a los resultados antes citados, Greenfield y colaboradores (1983b) reportaron que la lesión del tracto nigro-estriatal con 6-hidroxidopamina da origen a una disminución en la tasa de liberación "espontánea" de la enzima en el caudado. El valor del decremento obtenido se correlaciona estrechamente con el inducido por la aplicación nigral de alto potasio en animales no lesionados (cerca del 60% del valor de los niveles promedio liberados en condiciones de no estimulación). Con estos resultados, los autores sugieren que, en el núcleo caudado, la deshidrogenasa láctica probablemente es liberada a partir de un compartimiento subcelular de las terminales nerviosas dopaminérgicas y en forma asociada al aumento de la actividad de éstas por la activación de las propias neuronas nigroestriatales.

En la sustancia nigra, la lesión de la vía nigro-estriatal trae como consecuencia un decremento significativo en la tasa de liberación "espontánea" de la enzima y una reducción parcial ( $\approx 50\%$ ) en el aumento inducido por el alto potasio. Como ya se mencionó con anterioridad en el caso de la aminopeptidasa de "rápida movilidad" electroforética, la deshidrogenasa láctica parece derivarse parcialmente de las neuronas nigroestriatales dopaminérgicas (Greenfield y Col. 1983b). De hecho, se ha encontrado una estrecha correlación en los niveles de liberación de estas dos distintas especies enzimáticas en la sustancia nigra y el núcleo caudado en animales control o lesionados con 6-OHDA (Greenfield y Col. 1983b).

En resumen, debido a que la liberación de la LDH es modificada localmente y, en el núcleo caudado por la administración nigral de altas concentraciones de potasio, se sugiere que la enzima, tradicionalmen-

te usada como una proteína de "escape", no debería considerarse únicamente como indicador bioquímico del daño tisular en los experimentos de perfusión del tejido nervioso (Greenfield y Col. 1983b). La estrecha correlación entre la liberación de la LDH y la de la isoenzima de "rápida" movilidad electroforética de aminopeptidasa en todas las condiciones experimentales estudiadas, implicaría que las dos proteínas podrían ser coliberadas o, aún, coalmacenadas en las mismas terminales de las neuronas nigroestriatales (Greenfield y Col. 1983b). Sin embargo, hasta el momento actual, todavía no se han hecho estudios con el propósito de investigar el significado funcional de dicho proceso secretorio.

Liberación de acetilcolinesterasa y colinesterasa no específica.- Aunque normalmente consideradas como enzimas unidas a la membrana plasmática (Silver, 1974), la acetilcolinesterasa (AChE) y la colinesterasa inespecífica (ChE) también existen en formas solubles (Chubb y Smith, 1975 a). De estas dos especies enzimáticas, la AChE es la proteína que mejor ha sido estudiada como representante de proteínas liberables del sistema nervioso.

Originalmente se pensaba que toda la AChE se encontraba unida a la membrana, a pesar de que se había observado su presencia en los espacios extracelulares de la placa neuromuscular y del sistema nervioso central (Kreutzberg, 1974). En la actualidad, se sabe que la cantidad de enzima unida a la membrana representa un tercio de la poza celular total (menos de la décima parte de la fracción recién sintetizada se incorpora a la membrana plasmática) (Rotundo y Fambrough, 1980 a y b). La porción unida a la membrana no participa del fenómeno secretorio, la fracción liberable es la soluble, localizada intracelularmente. Mediante procedimientos de electroforesis con geles de poliacrilamida, se han reportado cinco isoenzimas solubles de la AChE (Chubb y Smith, 1975 a), de las cuales, la iso especie de más baja movilidad electroforética ("isoenzima 5") ha sido liberada en diversas preparaciones de tejido del sistema nervioso central y periférico.

Los primeros antecedentes de la liberación de la AChE se remontan hacia 1930, cuando Plattner y Hintner reportan la existencia de actividad de colinesterasa en el líquido cefalorraquídeo de humanos (LCR).

Sin embargo, a partir de esta fecha, poca atención se le dió al estudio del origen y significado funcional de la liberación de la enzima.

A priori, parecen existir dos fuentes posibles de procedencia que explicarían su presencia en el LCR: una de ellas es que la enzima provenga del plasma sanguíneo y que llegue al LCR, al igual que otros componentes de alto peso molecular de naturaleza protéica, a través de su filtración en los plexos coroideos (Davson, 1970); la otra posibilidad radicaría, como lo han señalado algunos autores, en que su origen derivara del tejido nervioso del cerebro y/o médula espinal (Yaksh y Col. 1973).

La primera hipótesis no parece muy razonable, ya que en el plasma solo existe la colinesterasa inespecífica; en cambio el LCR contiene altas actividades específicas de AChE. La segunda opción, por el contrario, parece más factible, en base al hecho de que una gran cantidad de neuronas del SNC exhiben inmunorreactividad y actividad enzimática de AChE, incluyendo a aquellas que se encuentran en contacto íntimo con el LCR del sistema ventricular cerebral. De este modo, la enzima podría liberarse hacia el LCR como resultado de la muerte neuronal o, como parte de un proceso de liberación fisiológica dependiente de la actividad nerviosa.

Las primeras investigaciones enfocadas en el estudio de la liberación de la AChE fueron hechas por Chubb y Smith. Estos autores mostraron un aumento de la concentración de la "isoenzima 5" en el líquido cefalorraquídeo del conejo mediante la estimulación nerviosa periférica (Chubb y Smith, 1974). En otra línea de resultados, también demostraron la liberación de la misma iso especie en perfusados de la médula adrenal (la cual recibe inervación colinérgica) cuando se aumentaba la concentración de potasio en el medio de incubación en presencia de calcio (Chubb y Smith, 1975 b).

En un estudio subsecuente en el conejo anestesiado, Chubb y colaborado-

res (1976) mostraron que la estimulación eléctrica de terminales centrales de los nervios ciáticos y safenos, la cual induce la liberación de acetilcolina, produce también un aumento significativo en la concentración de la "isoespecie 5" en el LCR. Proponen que el origen del aumento de la enzima no es plasmático, ya que su actividad específica en el LCR es mucho más alta que la del plasma. El hecho de que tanto la concentración de potasio como la de LDH se haya mantenido constante (antes y durante la estimulación), así como la existencia de la coliberación de acetilcolina y AChE por el estímulo despolarizante, sugiere que por lo menos una porción del incremento de actividad de AChE en el LCR es el resultado de una liberación dependiente del aumento de la actividad nerviosa. En paralelo a este trabajo, Fuenmayor y colaboradores (1976) corroboraron la cosecreción de acetilcolina y AChE en el LCR del cerebro del gato por la estimulación periférica del nervio ciático o por la administración sistémica del convulsivante pentilentetrazol.

Más tarde, en 1978, Younkin y colaboradores estudiaron la actividad de AChE y la sensibilidad de la acetilcolina a la acción de esta enzima en el músculo extensor digitorum longus de la rata mantenido en cultivo. Se observó que el material protéico del transporte axoplásmico que es liberado mediante la estimulación del nervio que inerva dicha estructura, aumenta la actividad de colinesterasa y la sensibilidad a la acetilcolina en forma paralela. Adicionalmente, se ha reportado que la deafferentación nerviosa (Guth y Col. 1964; Vigni y Col. 1976) y el bloqueo del flujo axoplásmico por colchicina o vinblastina (Max y Albuquerque, 1975; Fernandez e Inestrosa, 1976), causan un decremento importante de la actividad de la enzima. Markelonis y Oh (1978) han identificado y, parcialmente caracterizado, un componente protéico a partir de nervios periféricos, que parece ser el responsable del aumento de actividad de la AChE en la unión neuromuscular.

En una preparación de perfusión in vitro de nervio frénico-hemidiafragma de rata, Skau y Brimijoin (1978) estudiaron la liberación de AChE y acetilcolina por la estimulación eléctrica despolarizante del nervio. Los autores mostraron un aumento significativo simultáneo de la liberación de las dos sustancias al medio de incubación durante la

estimulación. Además, también demostraron que el aumento es dependiente de la presencia de calcio en el medio de perfusión y es antagonizado por altas concentraciones de magnesio.

En un estudio realizado en perros, Bareggi y Giacobini (1978) estudiaron los efectos de la administración sistémica de clorpromacina ( que aumenta la actividad colinérgica endógena) sobre la liberación de AChE en el LCR del sistema ventrículo-cisternal cerebral. Los autores mostraron que la aplicación del fármaco produce una elevación significativa de los niveles de actividad de la enzima, la cual muestra una tendencia de un gradiente creciente caudo-craneal. Sugieren que tal fenómeno podría apoyar el origen cerebral de la AChE liberada al LCR, en base a un aumento de la actividad neuronal colinérgica dependiente del estímulo con clorpromacina.

En apoyo a estos resultados, Greenfield y colaboradores (1978) reportaron un aumento significativo de la concentración de la AChE en el LCR del sistema ventrículo-cisternal del cerebro del conejo como consecuencia de la administración intraventricular del fármaco antes mencionado. El incremento de la enzima resultó más ostensible en la cisterna magna (cinco veces el valor basal promedio) que en el ventrículo lateral ( el valor obtenido aquí fue prácticamente igual al estimado en condiciones control). Los autores también encontraron que la inyección de atropina previa a la administración de la clorpromacina evitaba el aumento de la concentración de la enzima. En base a las diferencias de concentración de ésta entre la cisterna magna y el ventrículo lateral, sugieren que dicho fenómeno podría ser el resultado de una liberación de la AChE a partir de regiones subcorticales localizadas en una posición mas basal con respecto al núcleo caudado. De este modo , es probable que las células dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia nigra ( que muestran una excitación que es sensible a drogas anticolinérgicas como la atropina) las cuales contienen altas concentraciones de AChE y cuya frecuencia de disparo aumenta con la clorpromacina, sean las causantes de las diferencias de concentración observadas para la AChE en los sitios ya mencionados.

A partir de los primeros reportes que plantearon la posibilidad de estudiar las posibles fuentes de procedencia neural de la AChE liberada al LCR del sistema ventrículo-cisternal de mamíferos, diversos autores han ampliado tal cuerpo de información en base al estudio de la liberación de la enzima mediante la técnica de perfusión intracerebral con cánulas de infusión-extracción de líquido. Este procedimiento ha permitido localizar en forma más precisa las regiones cerebrales a partir de las cuales puede liberarse la AChE. A continuación revisaremos algunos de los trabajos realizados que orientan en tal sentido.

En un primer reporte, Greenfield y Smith (1979) reportaron un incremento significativo en los niveles de AChE, pero no de ChE, en el LCR de la cisterna magna del conejo como consecuencia de la estimulación eléctrica local del núcleo caudado o la sustancia nigra. Proponen, como sustrato neurofisiológico de este fenómeno, un aumento de la actividad del sistema nigro-estriatal y, por ende, plantean la necesidad de localizar en forma más definida el origen de la AChE liberada al LCR mediante la perfusión local de ambas estructuras implicadas en la vía nigro-estriatal dopaminérgica.

Usando el sistema de perfusión intracerebral con un dispositivo de cuatro cánulas implantadas simultáneamente (dos en ambos núcleos caudados y otras dos en cada una de las sustancias nigras), Greenfield y colaboradores (1980 y 1983 a) demostraron la existencia de la liberación de AChE y ChE en dichas regiones subcorticales. En ambas estructuras lograron detectar la liberación "espontánea" de las dos enzimas. La aplicación local de alto potasio en una sustancia nigra no indujo cambios en la tasa de liberación "espontánea" de la ChE en las dos sustancias nigras y núcleos caudados. Por otro lado, la liberación local y del núcleo caudado contralateral de AChE sufrió un incremento significativo; sin embargo, un efecto opuesto se observó en el núcleo caudado ipsilateral y en la sustancia nigra contralateral (Greenfield y Col. 1980).

Los cambios de la liberación de AChE en los sistemas nigro-estriatales

de ambos hemisferios cerebrales, inducidos por la aplicación nigral unilateral de alto potasio, son difíciles de relacionar a alteraciones en la actividad del sistema neuronal colinérgico de la sustancia nigra. En primera instancia, se ha reportado un bajo contenido nigral de acetilcolina y de su enzima de síntesis la colina-acetiltransferasa (Silver, 1974; Fonnum y Col. 1974). Secundariamente, aunque las neuronas nigroestriatales son colinoceptivas (Kimura y Col. 1981), todavía no se identifican sinapsis colinérgicas a este nivel (Kimura y Col. 1981; Levey y Col. 1983). Como último punto, se ha demostrado también que la liberación nigral de AChE no es afectada por la activación (Cuello y Col. 1981) o el bloqueo (Greenfield y Smith, 1979) de los receptores colinérgicos.

Así, la liberación nigral de AChE parece asociarse estrechamente con el sistema neuronal nigro-estriatal dopaminérgico. Butcher y Woolf (1982) han mostrado que cada neurona nigroestriatal que contiene dopamina, también posee AChE. Además, Lehman y Fibigier (1978) reportaron con experimentos de homogenización de tejido estriatal, que el 12% del total de la actividad de la AChE detectada parece ser de origen presináptico y atribuible a las terminales axónicas aferentes de las células nigroestriatales dopaminérgicas.

Con el objeto de determinar el grado de participación del sistema nigro-estriatal dopaminérgico en la liberación de AChE y ChE, Greenfield y colaboradores han medido, bajo condiciones de lesión del tracto nigro-estriatal con 6-OHDA, la liberación de las dos actividades enzimáticas en la sustancia nigra y núcleo caudado.

La primera línea de resultados demuestran un decremento en la liberación "espontánea" de AChE en ambas regiones. En el núcleo caudado, la magnitud de la reducción fué aproximadamente de un 70% del valor control promedio, el cual se corresponde con la disminución obtenida en la misma estructura en animales no lesionados por la aplicación nigral de alto potasio. Estas observaciones sugieren entonces, que cerca del 70% de la AChE liberada en el caudado tendría una procedencia presináptica, a partir de las terminales nigro-estriatales dopaminérgicas.



Este estimado es, por mucho, más alto que el 12% reportado en los estudios bioquímicos de homogenados estriatales por Lehmann y Fibigier.

En la sustancia nigra, el decremento en la tasa de liberación "espontánea" inducido por la lesión se correlaciona paralelamente con una depleción del contenido tisular de dopamina. Parecería así, que la AChE liberada de las neuronas nigrales derivaría exclusivamente de las células nigroestriatales dopaminérgicas. La hipótesis se ve corroborada por el hallazgo que demostró la ausencia de respuesta en la liberación nigral de AChE inducida por la aplicación local de alto potasio en animales lesionados (Greenfield y Col. 1983 a).

Con respecto a la ChE, los resultados de lesión del sistema nigro-estriatal dopaminérgico demostraron una marcada disminución en la liberación "espontánea" de la enzima en la sustancia nigra y el núcleo caudado. Dicho resultado implica que, aunque su tasa de liberación "espontánea" no se modificó en ambas estructuras por la administración nigral de concentraciones despolarizantes de potasio, su liberación en condiciones de "reposo" ocurre preferencialmente a partir de las neuronas nigro-estriatales dopaminérgicas (Greenfield y Col. 1983b).

Estos resultados se ven ampliados por los estudios de la liberación de ambas actividades enzimáticas durante la activación del sistema nigro-estriatal dopaminérgico con el agonista dopaminérgico anfetamina. Así, cuando se administró el fármaco en la sustancia nigra, la liberación "espontánea" de la ChE no sufrió cambios ostensibles locales o en el núcleo caudado ipsilateral (Greenfield y Shaw, 1982). Sin embargo, por el contrario, la liberación "espontánea" de AChE sí mostró un incremento y una disminución en las mismas estructuras, respectivamente. Las modificaciones inducidas en la liberación de esta última enzima por la activación del sistema nigro-estriatal dopaminérgico son análogas a aquellas que se observan en la liberación de dopamina por la aplicación nigral de anfetamina (Leviel y Col. 1979). En apoyo a esta observación, Greenfield (1984 a) ha demostrado un estrecho paralelismo entre la liberación de AChE y la liberación dendrítica nigral de dopamina en base a dos observaciones: ausencia de bloqueo en la libe-



ración "espontánea" de ambas sustancias por la administración local del bloqueador del impulso nervioso tetrodotoxina (TTX); y por otro lado, liberación estimulada por alto potasio que es dependiente de la presencia de calcio en el medio de perfusión.

Así, en resumen, la liberación de la enzima ChE parece derivarse de las terminales aferentes, cuerpos celulares y dendritas de las células nigroestriatales dopaminérgicas. De cualquier forma, su liberación "espontánea" no se modifica por el tratamiento despolarizante del tejido nigral. Desde este punto de vista, su presencia en el líquido extracelular no estaría supeditada a un proceso secretorio dependiente de respuestas modulatorias asociadas a señales de actividad neural específicas. En nervios periféricos, se ha propuesto que la ChE puede ser liberada de las terminales axónicas de nervios mielinizados como "material trófico", con el fin de mantener la integridad estructural de las vainas de mielina (Singer y Steinberg, 1972; Hines y Garwood, 1977). - En la sustancia nigra, quizá uno de los significados funcionales de la liberación de la enzima pudiera residir en una acción análoga sobre los axones mielinizados de esta estructura, o, dentro de un contexto más general, en el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática de las propias neuronas nigroestriatales (Greenfield, 1984a).

Por lo que toca a la AChE, el significado funcional de su liberación - en el caudado a partir de las terminales nigroestriatales también es difícil de vislumbrar por ahora. El hecho de que una alta proporción de su forma soluble liberable se encuentre a nivel presináptico, al igual que la fracción asociada a la membrana, sugiere que la poza liberable de la proteína no estaría relacionada únicamente a la inactivación de la acetilcolina (Greenfield, 1984b). Sin embargo, no disponemos, - todavía, de evidencias experimentales que propongan, en tal sentido, las posibles funciones no colinérgicas de la AChE liberada en esta estructura, a pesar del hecho de la existencia de una alta densidad de - células colinérgicas a este nivel (Dray 1979).

En la sustancia nigra, por el contrario, no existe información experimental convincente que apoye la existencia de transmisión colinérgica

(Greenfield, 1984b). Aún así, los resultados sobre la liberación local de la AChE plantean dos aspectos relevantes: origen exclusivo de la enzima a partir de las células nigroestriatales dopaminérgicas: compartir características de liberación y almacenamiento intracelular - (retículo endoplásmico rugoso) en las dendritas de las células nigroestriatales similares a dopamina (Mercer y Col. 1979; Liesli y Col. 1980).

Debido a las similitudes biológicas entre AChE y dopamina y, en base al planteamiento de que la última sustancia actúa muy probablemente como agente neuromodulador inhibitorio de la actividad de disparo de las células nigroestriatales dopaminérgicas (Bunney y Col. 1973; - Hefti y Lichtensteiger, 1978), se ha planteado la posibilidad de un papel funcional análogo para la AChE (Greenfield, 1981).

En apoyo a lo anterior, Greenfield y colaboradores (1981, 1984b) han medido los efectos de la aplicación nigral de AChE exógena (con - dosis que simulan la concentración extracelular de la enzima liberada endógenamente) sobre la actividad de la vía nigro-estriatal, mediante el registro de dos aspectos funcionales asociados a este tracto nervioso: electrofisiológicamente, analizando la actividad de disparo de las neuronas nigroestriatales; conductualmente, detectando la - disparidad entre la actividad de las dos vías nigro-estriatales a través de la aparición de la conducta de giro en el animal.

Sus resultados demuestran que la aplicación exógena de la enzima - inhibe la tasa de disparo de las células nigro-estriatales. Reportes colaterales del mismo autor que ponen de relieve la ausencia de efectos de la administración nigral de butirilcolinesterasa (análogo - enzimático con alta afinidad por la acetilcolina) indican que la acción inhibitoria de la AChE no es mediada indirectamente a través de la - hidrólisis de la acetilcolina (Greenfield y Col. 1981). En esta forma, aunque no se conocen todavía los mecanismos mediante los cuales la - AChE inhibe el disparo de esta población neuronal, su liberación - tendría, en el contexto de estos resultados, un significado funcional en la fisiología de las células nigroestriatales dopaminérgicas.

Por lo que toca a los estudios conductuales, se ha demostrado con anterioridad (Ungerstedt, 1971), que la lesión unilateral de la vía nigro-estriatal dopaminérgica con la inyección nigral de 6-OHDA en la rata induce un patrón de giro en dirección contralateral al sitio lesionado. Por lo tanto, dicho comportamiento puede ser visto como un indicador del desequilibrio en el contenido de la dopamina almacenada en las terminales dopaminérgicas entre ambos estriados (Pycock, 1980). Sin embargo, en ratas no lesionadas, Greenfield y colaboradores (1984b) mostraron que posterior a la inyección nigral de AChE, pero no de butirilcolinesterasa, la amfetamina administrada sistémicamente (IP) induce la conducta de giro en dirección contralateral al sitio de inyección de la enzima.

También en el mismo trabajo, se reportó que la inyección de una fracción altamente purificada de AChE (que exhibía una movilidad electroforética similar a la "isoenzima 5") era más potente en provocar tal conducta que la preparación comercial comúnmente usada (la cual contenía diversas formas de la AChE con alta actividad hidrolítica sobre la acetilcolina). Interesantemente, los efectos conductuales, producto de una sola dosis de inyección de la enzima, podían mantenerse por más de tres semanas. En base a los resultados anteriores, los autores concluyen que la AChE liberable probablemente tenga una función nigral importante, independiente de la hidrólisis de acetilcolina, ejerciendo cambios quizá a largo plazo (modulatorios) que influyen la actividad del sistema nigro-estriatal dopaminérgico.

Recientemente, Weston y Greenfield (1986) han propuesto que la liberación estriatal de la AChE estaría relacionada con la frecuencia de disparo de las neuronas nigro-estriatales. En la sustancia nigra, por el contrario (en donde muy probablemente su secreción se lleva a cabo del árbol dendrítico de estas células), el proceso sería independiente de la activación de este grupo celular por potenciales de acción mediados por conductancias al sodio, pero sí posiblemente dependiente de conductancias dendríticas específicas al calcio (la ausencia de efectos con TTX apoyan tal propuesta).

Por último, a raíz de varias líneas de trabajos, han surgido a la luz otras posibles alternativas funcionales de la enzima en la fisiología nerviosa. Chubb y colaboradores (1983) mostraron evidencias experimentales que indican que la AChE muestra una clara actividad de peptidasa en la hidrólisis de sustratos peptídicos tales como sustancia P y encefalinas y, más aún, sobre el molde precursor, en la generación de estas últimas (Chubb y Col. 1980). Recientemente, Small y colaboradores (1986) señalaron que dicha actividad puede ser similar a tripsina, y capaz de hidrolizar sustratos protéicos de alto peso molecular como Cromogranina A, para producir diferentes polipéptidos con bajo peso molecular.

En resumen, desde un punto de vista general, se podría proponer que las enzimas liberadas hacia el espacio extracelular podrían tener potencialmente la capacidad de ejercer acciones modulatorias (esto es, a largo plazo), debido fundamentalmente a su gran tamaño molecular y constantes de difusión y degradación relativamente lentas. Los estudios sobre la liberación y acciones de la AChE sugieren, que así como un transmisor convencional (ejem. dopamina) puede funcionar en forma no convencional como neuromodulador, así también las enzimas podrían ejercer un papel modulatorio, independientemente de su acción enzimática normal.

Es por todos estos antecedentes que nuestros hallazgos de liberación de proteína del sistema nervioso central es particularmente interesante (ver sección de resultados en la presente tesis) e invitan a la caracterización bioquímica y funcional del material liberado.

III

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

La descripción de la metodología empleada en esta tesis se encuentra desglosada en tres publicaciones que se anexan y que conforman el cuerpo de la sección de resultados ( ver I, II y III). Así, a continuación se dará solo una guía con el fin de localizar la descripción de cada procedimiento metodológico empleado en el desarrollo experimental.

A. CANULAS DE PERFUSION.- Los detalles de construcción y de diseño de las cánulas usadas en nuestros experimentos de perfusión se encuentran referidas en las siguientes publicaciones: I) Push-pull perfusion studies on the in vivo release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides-enkephalins from the rat brain. Pags. 71, 72 y 73, Figs.1 y 2. II) Release of proteins, enzymes, and neuroactive peptides, enkephalins from the striatum of the freely moving rat. Pags.402 y 403 , Fig. 1.

B. PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS.- En nuestros experimentos de perfusión utilizamos a la rata como animal modelo de estudio. Las referencias de tipo de cepa empleada, sexo, peso, procedimientos quirúrgicos y sitio de implantación de las cánulas se encuentran referidas en las siguientes publicaciones: I) Push-pull perfusion studies on the in vivo release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides-enkephalins from the rat brain. Pags. 71, 72 y 73, Fig. 1 ; II) Release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins, from the striatum of the freely moving rat. Pags. 403 y 404 III) Diurnal rhythm of the in vivo release of enkephalin from the globus pallidus of the rat. Pags. 64 y 65.

C. PROCEDIMIENTOS DE PERFUSION.- Las condiciones ambientales de las sesiones de perfusión, procedimientos de bombeo de líquido, tipo de medio de perfusión usado, condiciones de estimulación despolarizante, y manejo de las fracciones colectadas, se refieren en las siguientes publicaciones: I) Push-pull perfusion studies on the in vivo release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides-enkephalins from the rat brain. Pags. 73 y 74; II) Release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins, from the striatum of the freely moving rat. Pag. 404; III) Diurnal rhythm of the in vivo release of enkephalin

from the globus pallidus of the rat. Pag. 64.

D. ENSAYO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.- Los ensayos bioquímicos utilizados en la determinación de agentes neurotransmisores peptídicos y no -- peptídicos, material protéico y, actividades enzimáticas liberados al perfusado en los procedimientos de perfusión, se detallan en las siguientes publicaciones: I) Push-Pull perfusión studies on the vivo release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides-enkephalins from the rat brain. Pags. 74, 75 y 76; II) Release of proteins, -- enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins, from the striatum of the freely moving rat. Pags. 404, 405 y 406; III) Diurnal rhythm of the in vivo release of enkephalin from the globus pallidus of the rat. Pags. 64 y 65.

I V

R E S U L T A D O S



Esta sección se encuentra conformada por los hallazgos experimentales vertidos en tres publicaciones, que se insertan a continuación. En vista de esto, se dará una presentación y clasificación de los trabajos para su identificación y, posteriormente, se hará un breve resumen de los planteamientos experimentales al lector.

I). Bayón, A., Solano, S., Antón, B., Castaño, I., and Díaz-Pontones, D. (1985). Push-Pull perfusion studies on the in vivo release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides - enkephalins from the rat brain. In: In vivo perfusion and release of neuroactive substances (A. Bayón and R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press Orlando, Fla. pp. 69-93.

Este artículo constituye el primer reporte de los resultados que conforman esta tesis.

II). Bayón, A., Antón, B., Leff, P., and Solano, S. (1986). Release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins, - from the striatum of the freely moving rat. Ann. N.Y. Acad. Sci. 473: 401-417.

Este capítulo fué enviado por invitación a la Academia de Ciencias de Nueva York (y presentado en un simposio de la misma), e incluye resultados adicionales sobre la liberación "espontánea" y "estimulada" de - proteínas neurales.

III). Bayón, A., and Antón, B. (1986). Diurnal Rhythm of the in vivo - release of enkephalin from the globus pallidus of the rat. Regulatory Peptides, 15: 63-70.

Este artículo es la primera publicación formal y completa de los estudios (arriba reportados) sobre los ritmos de liberación in vivo de -- encefalinas y de GABA en el globus pallidus de la rata.

La técnica de perfusión intracerebral que utiliza cánulas concéntricas de infusión-extracción acopladas (Push-Pull) es la única que permite obtener información directa sobre la liberación in vivo de agentes neuroactivos en animales en libertad de movimiento. El traumatismo que produce la circulación del líquido en los sitios de perfusión, puede originar la obstrucción en el flujo del líquido y consecuentemente daño tisular que alteran y enmascaran las observaciones experimentales. Con el objeto de minimizar estos inconvenientes y limitaciones, se diseñaron y pusieron a prueba modificaciones a la geometría de las cánulas y sistemas de infusión-extracción, comparando su eficiencia y efecto sobre la viabilidad de la preparación. Las cánulas concéntricas de uso común, tienen la tubería interior (infusión) protruyendo del cuerpo de la exterior (extracción), favoreciendo el daño mecánico al tejido por la acción directa del flujo del líquido; la modificación que se ha introducido evita esta protrusión, manteniendo la tubería interna dentro del cuerpo de la externa, permitiendo el contacto del líquido con el tejido solo a través de ranuras laterales presentes en el extremo terminal de la tubería externa. Adicionalmente se ha modificado también el sistema de extracción (normalmente aislado de la presión atmosférica) permitiendo la entrada de aire en el mismo, con el fin de evitar el desarrollo de presiones negativas en el sitio perfundido y con esto, el desarrollo de lesiones importantes (Nieoullon y Col. 1977)

Ya que los procedimientos de perfusión se encuentran dentro de los métodos que afectan al sujeto bajo estudio, existe la necesidad de investigar el efecto que los mismos tienen sobre la funcionalidad y viabilidad del tejido bajo estudio. Por lo común, este requisito (conocer el grado de lesión que producen), ha sido satisfecho mediante el uso de técnicas de control electrofisiológicas e histológicas. Dentro de este contexto se ha documentado que la liberación de marcadores bioquímicos tisulares hacia los perfusados ofrecen información en el registro del daño tisular que se suscita durante el curso de una perfusión (Yaksh y Yamamura, 1974; Honchar y Col. 1979).

La medición de estos parámetros bioquímicos ha sido también de utilidad en la exploración de la funcionalidad y viabilidad del tejido durante el curso de la perfusión, al examinar la capacidad de éste para liberar sustancias neurotransmisoras.

En esta forma, se ha explorado la utilidad de diversas actividades enzimáticas, material protéico total y transmisores representativos peptídicos (encefalina) y no peptídicos (GABA) como indicadores bioquímicos de daño y responsividad tisular durante la perfusión in vivo de regiones estriatales.

Para comparar el funcionamiento de los dos diseños de cánula, hemos usado como indicadores "físicos" de lesión el sangrado y la recuperación disminuida de líquido de perfusión. Con el mismo propósito hemos empleado marcadores "bioquímicos" de lesión, de eficiencia en la difusión tejido-medio y de viabilidad del tejido durante la perfusión. En este contexto, evaluamos también los beneficios que da el uso del sistema de extracción de líquido abierto a la presión atmosférica sobre el sistema aislado tradicional.

Finalmente, el sistema optimizado nos ha permitido estudiar la liberación evocada por distintos procedimientos despolarizantes de sustancias protéicas de origen neural aún no caracterizadas, las cuales se han podido medir con los reactivos usados tradicionalmente en la determinación de proteínas.

Asimismo, hemos podido estudiar la regulación de la liberación de agentes neurotransmisores como GABA y encefalinas en áreas específicas del sistema nervioso central donde se ha postulado su interacción funcional y hemos correlacionado estos hallazgos neuroquímicos con eventos fisiológicos-ritmos diurnos de actividad-en el animal vivo.

PUBLICACION

I

# Push–Pull Perfusion Studies on the *in Vivo* Release of Proteins, Enzymes, and the Neuroactive Peptides—Enkephalins from the Rat Brain

ALEJANDRO BAYÓN, SARA SOLANO,  
BENITO ANTÓN, IRENE CASTAÑO, AND  
DAVID DÍAZ-PONTONES

*Departamento de Biología Molecular  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Mexico City, Mexico*

I. Introduction .....	69
II. Methods .....	71
A. Cannula .....	71
B. Surgical Procedures .....	72
C. Perfusion Procedures .....	73
D. Assay of Biological Samples .....	74
III. Findings .....	76
A. Optimization of Experimental Procedures .....	76
B. Neurobiological Applications .....	83
IV. Perspectives .....	90
References .....	90

## I. INTRODUCTION

The fundamental role that *in vitro* neurochemical techniques have played in understanding the chemical coding of brain function has made us aware of some of their limitations. Thus, surgically isolated brain regions and mechanically fractionated cellular and subcellular structures facilitate the

control of the experimental conditions in which they are studied, but as a consequence of this isolation, their normal connections with the brain, the whole organism, and the environment are lost. Therefore, to study the physiological regulation of neurochemical events and their integration into neural function, an *in vivo* approach is needed. The most obvious one is to create a superfusion system analogous to those used *in vitro*, but instead of the tissue sample being placed inside a bath, the bath is implanted in the brain tissue of a live animal. Cups, needles, concentric cannulae, and dialysis bags and fibers all introduce a stream of artificial physiological fluid in the brain, allowing the administration and sampling of chemicals into and from defined neural structures.

Because of this common working principle some of the basic technical problems and limitations of the *in vivo* perfusion methods were previously revealed by methods *in vitro*. These difficulties, which must be controlled before any scientific questions can be asked, are lesion of the tissue produced by the perfusing device, by hydrodynamic accidents, or by the constant circulation of fluid through the tissue; the decrease of neural responsiveness of the tissue to stimulation and to pharmacological manipulations along perfusions; and the efficiency of the diffusional exchange between the tissue and the perfusion medium. The initial part of this chapter deals with the use of biochemical markers (proteins, peptides, and nonpeptide transmitters) to assess tissue damage and viability. In this context we describe an improved design of the tip of the concentric push-pull cannula, the probe most widely used for *in vivo* perfusion. Compared to the classical Gaddum cannula, this design (slot-tip cannula) produces less tissue damage during perfusion, keeps tissue responsiveness stable for several hours, and allows a tissue-medium exchange similar to that observed with the traditional model. In contrast with dialytrodes, which also reduce tissue damage during perfusion, slot cannulae allow the diffusion into the perfusates of both small chemicals and macromolecules (proteins and enzymes) released from brain tissue.

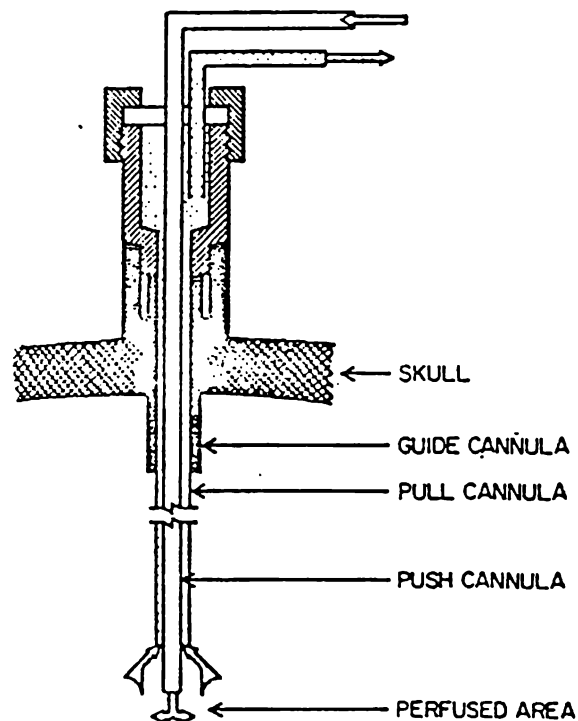
The body of this chapter deals with the *in vivo* release of proteins and peptides from the brain. In addition to classical transmission, other possible roles of these neurochemicals in brain function are a subject of increasing interest in neurobiology. Current evidence indicates that their availability at the release sites has a close dependence on the entire structure of the neuron, differing from nonpeptide messengers whose metabolism is mostly centered on the synaptic apparatus. Therefore, it seems to be particularly important to study peptide and protein release in integral pathways and circuits. Thus, we present data on the *in vivo* release of protein material and several enzyme activities from the brain; we also show evidence of the *in vivo*

release of the neuropeptides enkephalins, presenting results on the physiological regulation of this release in freely moving animals.

## II. METHODS

### A. Cannula

The basic design of the push-pull cannula used in these experiments (Fig. 1) is that of Gaddum (20), as adapted by Myers (41). Early work with this cannula in our laboratory gave a relatively high incidence of flow obstructions during perfusion (see Section III), which were found to be due to the presence of tissue fragments or clogs obliterating the tip or the shaft of the



**Fig. 1.** Gaddum-Myers push-pull cannula. The inlet (white) and outlet (dotted) tubing systems are concentric along the shaft of the cannula but separate after entering the upper chamber, which is constructed of two stainless-steel screwed pieces (dashed) and a rubber septum (white). The guide cannula used in our laboratory incorporates a clamping device (black) to fix the push-pull cannula. Note that the push cannula protrudes from the tip of the pull cannula.

pull part of the cannula. These obstructing materials are produced mainly by negative pressures developed at the perfused region and by the tissue-eroding effect of the stream of superfusing medium. The former effect is mostly dependent on the pressure balance of the pumping systems and can be successfully dealt with using a pull line open to atmospheric pressure (43). The erosion depends mainly on the geometry of the cannula tip and has been minimized by keeping the end of the inner push cannula within the outer pull tubing (30, 44, 45). Although this type of design shields the tissue from the direct mechanical effects of the outflowing stream, it reduces the diffusion interface at the cannula tip to the size of the cross-sectional area of the outer cannula, making it necessary to use wider probes that are unsuitable for small laboratory animals.

We have designed a new cannula tip (Fig. 2) which, besides providing the shielding effect previously noted, allows for a larger interface between the tissue and the perfusing medium, even using small-gauge cannulae. The push-pull cannula is constructed from 21-ga (thin wall) and 29-ga stainless-steel tubing (Small Parts Inc., Miami, Florida). Before assembling the outer and inner tubing to form a concentric Gaddum-Myers system, the 21-ga pull tubing is obstructed at the tip with soldering material and two slots are drilled under microscopic control on the sides of the shaft, just above the tip. The number and length of the slots can be varied depending on the size of the region to be perfused. Unilateral perfusion of restricted areas of the wall of the third ventricle (i.e., the periventricular vascular organ of the chick) has been possible using a single-slotted cannula. This probe has also been successfully used to perfuse large (caudate putamen) and small (substantia nigra) regions of the rat brain. In the sections that follow we present results obtained perfusing the area of the globus pallidus, where most of our tests of the performance of this cannula have been carried out.

## B. Surgical Procedures

Albino rats—local Wistar strain—weighing 150–200 g were anesthetized with sodium pentobarbital. Surgery, under aseptic conditions, is limited to the stereotaxic implantation of a stainless-steel 18-ga cannula which is chronically fixed with acrylic cement to the skull, serving as a guide for the acute insertion of the push-pull cannula (see Fig. 1). The lower end of the guide cannula is placed several millimeters above the brain region that will be reached by the tip of the push-pull cannula at the time of perfusion; this strategy avoids the gliosis which is found in the perfused area when the perfusing probe itself is chronically implanted into the brain (24). The upper end of the guide cannula (Fig. 1) was modified by adding a clamping device to impede rotational or axial movements of the push-pull cannula after it is



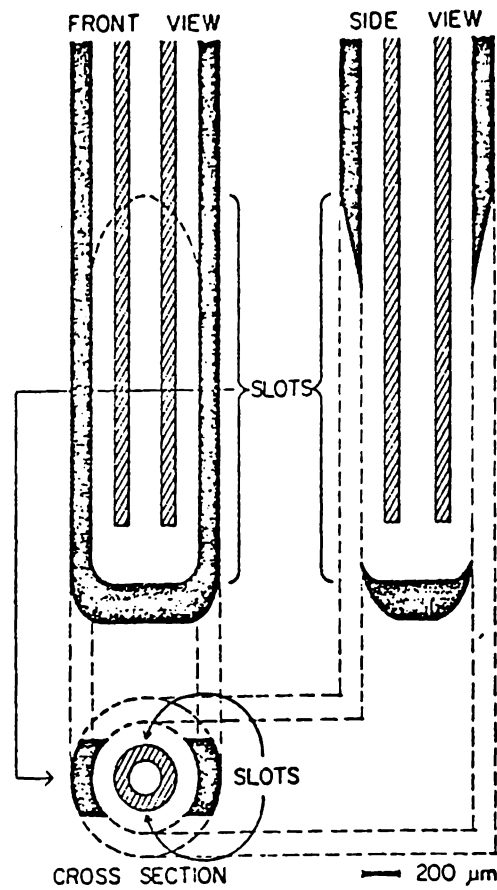


Fig. 2. Orthogonal projection of slot-tip modification of the push-pull cannula shown in Fig. 1. The design is drawn to scale, showing the double-slotted cannula used in this work. See text for construction details. (□), thin-walled 21-ga tubing; (▨), 29-ga tubing.

inserted; a tight fit between the outer pull cannula and the guide avoids other movements of the probe. After implantation, the lumen of the guide is temporarily blocked with a tight-fitting rod until the day of perfusion—1 week after surgery. During this time the implant is protected by a plastic cap covering the guide. The coordinates used for the globus pallidus and other brain regions were taken from the atlas of König and Klippel (34).

### C. Perfusion Procedures

Implanted animals were placed in transparent plastic cages—their usual housing—in a quiet, isolated room 2 hr before the beginning of the session and remained in a freely moving situation throughout the perfusion. The

animals were subjected to a single perfusion session. The protective mandrel was removed from the guide and the perfusing cannula slowly inserted and clamped in place. During early work in our laboratory the push and the pull ends of the cannulae were connected through polyethylene tubing to infusion and withdrawal syringes positioned in a Harvard reciprocating pump (5, 7). Currently, a continuous superfusion system has been adopted, using small-bore, thick-wall sylastic tubing and polystaltic cassette pumps (Manostat). This latter system is easier to handle than syringe pumping and also helps to prevent extreme pressure changes in the perfused area, such as those observed when changing syringes.

The standard perfusion medium is a Krebs–Ringer bicarbonate buffer: 127 mM NaCl, 3.73 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, D-glucose 2 g/liter. Bovine serum albumin (BSA) (0.1%), and bacitracin (30 µg/ml) were included in the medium as protective agents for enkephalin release studies (1). Chemical stimulation of the perfused tissue was produced by substituting K<sup>+</sup> for Na<sup>+</sup> ions in the standard medium to reach a 50 mM K<sup>+</sup> concentration. From the onset of the sessions the flow rate was held constant (25 µl/min) and effluent fractions collected every 15 min. During the experiments, infused and collected fluid volumes were routinely measured, and there was constant monitoring for the presence of blood in the effluent. Abnormal animal behavior (motor disturbances, persistent drowsiness, hyperactivity, excessive grooming, salivation, etc.) was also recorded. At the end of the perfusion, the position of the tip of the cannula was verified by inspection of frontal sections of the brain under a dissection microscope.

During study of enkephalin release into the effluent medium, fractions were collected in plastic tubes containing 0.5 ml of 2.0 N ice-cold acetic acid in order to stop enzymatic degradation; these fractions were then boiled for 15 min, lyophilized, and resuspended in phosphate saline buffer for the enkephalin radioimmunoassay (RIA). When release of protein, enzyme activities, or radioactive tracers were studied, the perfusate fractions were aliquoted, frozen, and promptly assayed.

#### D. Assay of Biological Samples

Protein release was determined by the method of Lowry *et al.* (38), using BSA as the standard; the reaction volume was reduced and the sample volume increased in order to improve the sensitivity of the assay. Lactic acid dehydrogenase (LDH) activity was determined using pyruvate as substrate (10). Also, in order to increase the sensitivity of the assay, incubation volume was reduced, sample volume increased, and reaction time extended to 24 hr. When assaying perfusate samples with low LDH activities the initial

velocities were linear for at least 12 hr and plots of enzyme concentration vs reaction velocity gave straight lines. Similar assay modifications also produced higher sensitivities when measuring acetylcholinesterase (AChE) [using acetylthiocholine iodide as substrate (17)] and protease activities [Hide powder azure as substrate (49)]. Units of enzyme activity are expressed in nanomoles of substrate/hr. Only protease activity is expressed in absorbance units/24 hr.

In order to study the release of exogenous GABA, tritiated  $\gamma$ -aminobutyric acid ( $[^3\text{H}]\text{GABA}$ , specific activity 34 Ci/mmol, Amersham) was added to the standard perfusion medium at the beginning of the perfusion ( $4\text{--}20 \times 10^6$  cpm in 750  $\mu\text{l}$ , perfused in 30 min). The  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  and metabolites not retained or taken up by the tissue were washed out during the 1–2 hr that followed. During this process and throughout the rest of the perfusion, 10- $\mu\text{l}$  aliquots from each collected fraction were counted in tritosol (19) to determine the resting and the evoked release of  $[^3\text{H}]\text{GABA}$ . The fraction of the tritiated material in the perfusates which was contributed by  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  was determined by analysis of the samples in ion-exchange chromatography, followed by TLC (51). In spite of the fact that no inhibitor of GABA metabolism was added to the perfusing media 60% of the tracer released during the third hour of perfusion was GABA. This proportion was reduced to 30% after the sixth hour. When release was evoked by depolarization, the fraction of counts coeluting with GABA was more than 50% higher than that found in perfusates obtained during resting conditions. Since these ratios remained constant in the different experimental conditions presented in this work, release data were calculated from uncorrected total counts per minute in the perfusate fractions.

The release of endogenous immunoreactive enkephalin was determined by RIA. In addition to the Leu-enkephalin RIA that we have previously reported (5, 7, 50), two new assays have been developed. Glutaraldehyde conjugates of BSA-Met-enkephalin and BSA-Leu-enkephalin were purified by gel filtration and emulsified in complete Freund's adjuvant. Antisera were raised in rabbits during a 3-month immunization schedule. Either  $^{125}\text{I}$ - or  $^3\text{H}$ -labeled enkephalins were used as tracers and the free and bound enkephalins were separated with activated charcoal-dextran suspensions. When a final antiserum dilution of 1:1500 was used, the lowest detectable amounts of unlabeled enkephalins were 10–50 pg using  $^3\text{H}$ -labeled tracers, and 2–5 pg using  $^{125}\text{I}$ -labeled tracers. Leu-enkephalin cross-reacts 8% in the Met-enkephalin assay and Met-enkephalin cross-reacts 0.3% in the Leu-enkephalin assay; enkephalin fragments and endorphins cross-react less than 0.1% in the Met-enkephalin assay and less than 0.001% in the Leu-enkephalin assay. Both the Met- and the Leu-enkephalin assays have been validated with tissue samples. In order to facilitate the comparison of the

results presented here with previous reports from our laboratory, we show only the data obtained with Leu-enkephalin RIAs; nevertheless, similar results were obtained using a Met-enkephalin assay. Since the Leu-enkephalin RIAs also read Met-enkephalin, an "enkephalin unit" has been defined: it is the enkephalin immunoreactive material that produces a displacement of tracer in the assay equal to that observed with 1 picogram of synthetic Leu-enkephalin (50). All perfusate samples were assayed at two dilutions and in duplicate.

### III. FINDINGS

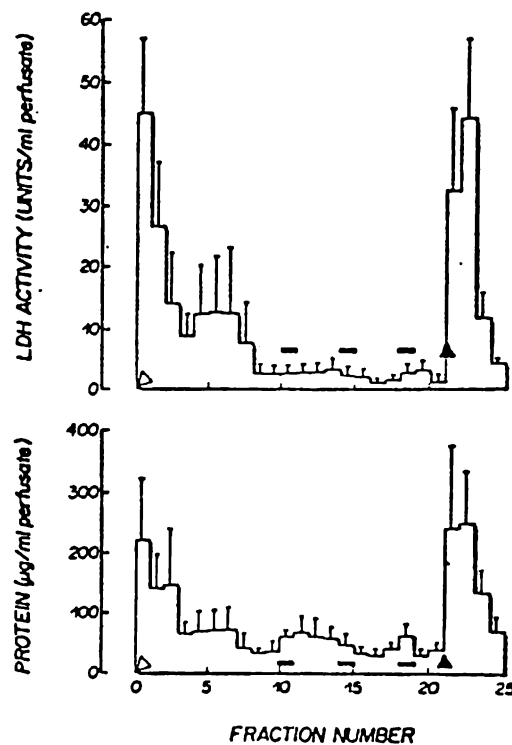
#### A. Optimization of Experimental Procedures

##### 1. RELEASE OF PROTEIN, LACTATE DEHYDROGENASE, PROTEASES, ACETYLCHOLINESTERASE, <sup>3</sup>HGABA, AND ENKEPHALINS AS BIOCHEMICAL MARKERS OF TISSUE VIABILITY DURING *IN VIVO* PUSH-PULL PERFUSION OF THE STRIATUM

*In vivo* push-pull perfusion techniques fall into the kinds of methods that conspicuously affect the subject under study. The need to assess the effect of perfusion on tissue viability has been fulfilled by using histological or electrophysiological controls of damage and functionality. However, it is often overlooked that biochemical markers released in the perfusate can give information on the tissue damage occurring during a perfusion session (28, 57). Biochemical measurements also help to assess the functionality of the tissue during the course of a perfusion session, testing its capability for releasing exogenous and endogenous neurotransmitters. Thus, we have explored the suitability of several enzyme activities, total protein material, and representative peptide (enkephalin) and nonpeptide (GABA) transmitters as biochemical indicators of tissue damage and tissue responsiveness during *in vivo* perfusion of striatal regions. Gaddum and slot cannulae were indistinctly used in this part of the work.

We initially studied the release of two possible lesion markers during *in vivo* perfusion. Protein release into perfusates has been used earlier as a lesion marker (57). However, protein is always present and easily measured in perfusates because its normal level in the extracellular fluid of the nervous tissue is high (26). For this reason, only marked surges of protein content in perfusates have been used as indicators of tissue damage. LDH is a soluble cytoplasmic enzyme, also normally found in plasma, which is the most widely used marker of tissue damage both in biochemistry and in clinical medicine. Its level in perfusates is expected to increase as a consequence of cell lysis (by tissue erosion or by accidental mechanical damage) or after

extravasation of serum (by edema or by rupture of capillaries). Figure 3 shows the release of LDH activity and total protein into perfusate fractions obtained during perfusion of the globus pallidus of the rat. Acute insertion of the cannula, disrupting the tissue, releases a high amount of LDH and protein into the perfusates. Mechanical damage by withdrawal and reinsertion of the cannula—intentionally produced just before terminating the perfusion session—induces an outflow of both putative lesion markers. Accidental lesions occurring during individual perfusions are also reflected in the release of these markers: bleeding episodes or flow obstructions leading to serious volume deficits (higher than 5% per collected fraction) invariably produce significant surges of LDH and protein in the perfusates. Four out of the ten animals perfused to compose Fig. 3 had severe flow obstructions during the second hour of perfusion (see fractions 5–8). These results indi-



**Fig. 3.** Release of LDH activity and total protein during push-pull perfusion of the globus pallidus in freely moving rats. Insertion of the cannula is marked ( $\nabla$ ) at the beginning of perfusion. In fractions 11, 15, and 18 ( $\blacksquare$ ), the perfusing medium contained 50 mM  $K^+$ . Close to the end of the perfusion session the cannula was removed and then reinserted in place in order to produce mechanical damage to the tissue ( $\blacktriangle$ ). The LDH assay (upper panel) and protein determination (lower panel) were as described in Section II. The bars represent the mean  $\pm$  SEM of fractions collected in 10 perfusion sessions with different animals.

cate that tissue damage is marked by surges of protein and LDH. Moreover, about 10% of the surges of LDH and protein detected in individual perfusions occur in the absence of any obvious perfusion problems, suggesting that these biochemical markers are more sensitive in detecting tissue damage than physical observations—bleeding or volume deficits in perfusates.

However, increases in these markers produced by causes other than tissue lesions were not discarded a priori (16). Results in Fig. 3 already indicate that protein release, but not LDH release, is increased by chemical stimulation of the globus pallidus. Therefore, we compared the release of proteins, LDH activity, and also of the putative lesion markers AChE and proteases, under conditions of chemical depolarization (50 mM K<sup>+</sup>) and mechanical lesion. Proteolytic activity, mainly associated with lysosomes, and AChE activity, mostly membrane bound (but some soluble intracellularly and also present in blood), would also be expected to increase in perfusates after severe tissue disruption (37). Table I shows that high K<sup>+</sup> concentrations stimulate the release of protein both in the globus pallidus and in the caudate putamen of the rat and, only in the caudate, the release of AChE activity. Depolarization-induced release of LDH or protease activities was not observed. In contrast, mechanical damage elicited an increased release

TABLE I

Release of Enzyme Activities and Total Protein from Striatal Regions Evoked by Chemical Depolarization or by Mechanical Damage<sup>a</sup>

	Globus pallidus		Caudate putamen	
	Depolarization-induced release (% of control)	Mechanically induced release (% of control)	Depolarization-induced release (% of control)	Mechanically induced release (% of control)
LDH	105 ± 23	2010 ± 616	114 ± 16	1870 ± 720
Proteases	125 ± 25	216 ± 65	108 ± 19	156 ± 18
AChE	134 ± 14	284 ± 113	240 ± 60	660 ± 400
Protein	250 ± 62	1700 ± 580	275 ± 24	2500 ± 600

<sup>a</sup> Release was induced by depolarization with 50 mM K<sup>+</sup> in the perfusing medium or mechanically by withdrawal and reinsertion of the push-pull cannula. Data are expressed as % ± variation coefficient (N = 4) of the resting release values per milliliter of perfusate. In the globus pallidus these control values were: LDH, 6.5 ± 2.7 units; proteases, 12 ± 1 units; AChE, 2.6 ± 0.4 units, and protein, 30 ± 4 µg. In the caudate putamen resting values were: LDH, 16.0 ± 4.2 units; proteases, 12.5 ± 2.0 units; AChE, 5.0 ± 0.9 units, and protein, 60 ± 20 µg.

of all four markers in the caudate and in the pallidum. It is worth noting that the mechanically induced release was always higher than that evoked by depolarization.

The results presented here indicate that LDH activity and, less conspicuously, protease activity can be used as reliable markers of tissue damage during push-pull perfusion. This is not so for protein and AChE activity. Greenfield et al. (22, 23) had already shown that protein and AChE activity are released after chemical depolarization from the substantia nigra and the caudate nucleus in the anesthetized cat. Our results confirm and extend these observations to the caudate-pallidal region in the freely moving rat. Although the origin of these proteins released from the brain by chemical stimulation is not yet clear, preliminary experiments (Oksenberg et al., in preparation) indicate that at least some of them can be synthesized from labeled precursors injected in the striatum. Thus, these substances, first proposed as lesion markers, have become the subjects of neurobiological inquiries regarding their possible roles in neurochemical signaling.

The ability to detect tissue damage occurring during *in vivo* perfusions is not enough for validating the use of a particular perfusion system; tests of the functionality of the preparation during perfusion are required to assess the value of these techniques. The ability of the tissue to release chemical transmitters can be used for this purpose. Figure 4 shows the resting and the stimulated *in vivo* release of [<sup>3</sup>H]GABA and endogenous enkephalins, the two transmitters known to be most abundant in the globus pallidus of the rat (21, 58). As described in Section II, after a washout period the release of tritiated GABA was evoked by high K<sup>+</sup> concentrations in the perfusing medium, repeated stimulations releasing lower amounts of tracer (Fig. 4, upper panel). This decrease can be related to the metabolism of [<sup>3</sup>H]GABA and its exhaustion in the tissue pools (see Section II) and does not reflect progressive tissue damage. This conclusion is supported by the observation that a stable evoked release of endogenous enkephalin is observed after repeated stimulation (Fig. 4, lower panel) during perfusion sessions similar to those shown for GABA. This stability of the enkephalin-releasing systems during an *in vivo* perfusion session is particularly significant considering that earlier studies showed that enkephalin tissue stores in the pallidum are particularly labile to tissue damage. Thus, slicing of pallidal tissue decreases its enkephalin content by 30% (5). Also, enkephalin release *in vivo* is markedly reduced by the gliosis produced in animals that have been previously perfused in this region (5, 7). In our experiments the release of enkephalin and GABA in response to chemical stimulation was always blocked after severe mechanical damage to the tissue; partial recovery was seldom observed. Thus, changes in the release of endogenous enkephalin from the

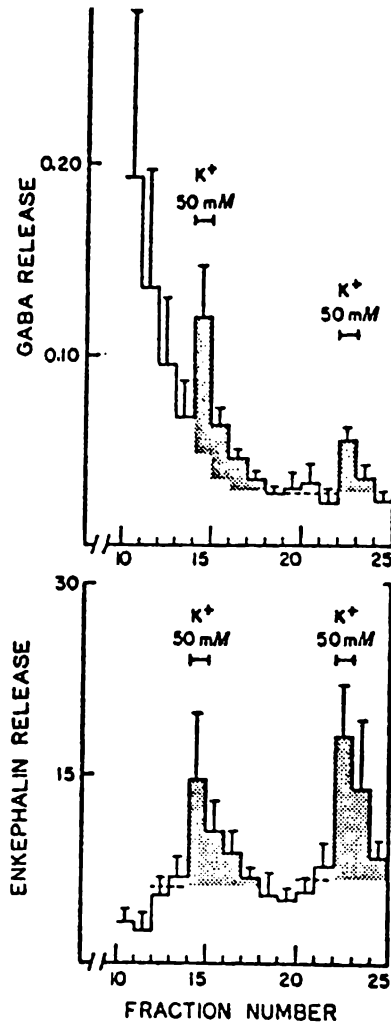


Fig. 4. Resting and stimulated release of [ $^3\text{H}$ ]GABA and endogenous enkephalin during *in vivo* push-pull perfusion of the globus pallidus of the rat. Upper panel: After insertion of the cannula, perfusions were started using the standard perfusing medium. For studying the release of exogenous GABA, [ $^3\text{H}$ ]GABA was added to the perfusing medium and circulated through the tissue within the first 30 min of the experiment. The profile of [ $^3\text{H}$ ]GABA released in the perfusate fractions is expressed as the percentage of the [ $^3\text{H}$ ]GABA uptake. The initial exponential washout phase is followed by a steady resting-release process (horizontal dashed line; see Kondo and Iwatsuro (33) for the calculation of this baseline). [ $^3\text{H}$ ]GABA release (shaded areas) was stimulated depolarizing the tissue with perfusing medium containing 50 mM  $\text{K}^+$ . Lower panel: For studying the release of endogenous enkephalin the fractions were processed, as described in Section II, for a Leu-enkephalin RIA, the results being expressed in enkephalin units (see Section II). Since the resting release of endogenous enkephalin varies during perfusion, in order to determine the enkephalin release stimulated by 50 mM  $\text{K}^+$  (shaded areas), prestimulation values were defined as the average enkephalin content of the two collections preceding the stimulation (dashed lines). Values in this figure are the average  $\pm$  SEM of fractions collected in 6 perfusion sessions performed from 4:30 P.M. to 10:30 P.M.



globus pallidus appear to be a suitable indicator of changes in the functionality and responsiveness of the region during perfusion. Exogenous GABA will be used as a secondary marker and as a control for the sampling efficiency of a probe.

## 2. COMPARISON OF THE PERFORMANCE OF THE GADDUM AND THE SLOT CANNULAE DURING *IN VIVO* PERFUSION

In order to evaluate the advantages or disadvantages of the modification of the tip of the push-pull cannula (described in Section II) compared to the traditional design, we have first analyzed the frequency of flow obstructions and vascular accidents observed during perfusions using these probes. Table II shows that with use of the modified slot model the bleeding episodes are reduced to those that occasionally, but almost unavoidably occur after the acute insertion of the cannulae; flow obstructions are also seen less frequently when using the slot cannula. Surges of LDH and protein were always associated with insertions and flow obstructions. However, the possibility was considered that this improvement in the hydrodynamics of *in vivo* perfusion could be due to a short circuit of the circulating fluid inside the tip of the slot cannula (see Fig. 2). Since this would produce an undesirable reduction of contact and diffusion between the tissue and the medium, we compared the efficiency of the slot and of the Gaddum cannula for sampling a tissue marker during perfusion. The protein present in perfusates obtained under resting conditions mostly represents a sampling of extracellular fluid. Perfusion was no indication that tissue damage was present—bleeding, volume deficits, or LDH surges—in these experiments. Figure 5 shows that no significant difference exists in the basal levels of protein in perfusates obtained using either one of these probes. This observation shows that the possible flow shunt previously mentioned, if present, does

TABLE II

Comparison of the Performance of the Gaddum and the Slot Cannulae:  
Frequency of Accidents during Perfusion<sup>a</sup>

	Bleeding episodes	Flow obstructions requiring cannula withdrawal
Gaddum	4 in 6 perfusions (2 on cannula insertion, 2 during perfusion)	5 in 6 perfusions
Slot	1 in 6 perfusions (on cannula insertion)	1 in 6 perfusions

<sup>a</sup> Results from a series of 12 6-hr perfusion sessions carried out to compare the Gaddum and slot cannulae. All bleeding episodes and severe flow obstructions are accompanied by increases in protein and LDH content in the corresponding perfusate fractions (see text).

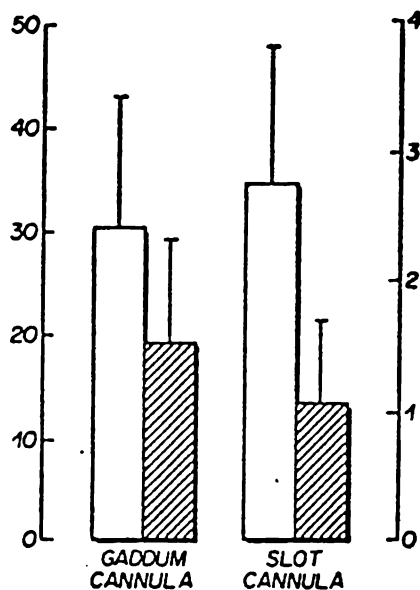


Fig. 5. Resting release of protein and LDH during perfusions using the Gaddum or the slot cannula designs. The values shown were obtained in 6 perfusion sessions (the vertical lines represent the SEM). (□), Resting content of protein in perfusates ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); (▨), resting activity of LDH in perfusates (units/ml).

not affect the efficiency of the slot cannula. In addition, the efficiency of both probes to deliver solutes into the perfused tissue was shown to be similar, since GABA uptake was about 30% using either cannula (data not shown).

Systems using the slot or the Gaddum cannulae were also compared in relation to the damage and to the viability of the tissue in the absence of perfusion accidents. LDH was used as the lesion marker. Figure 5 shows that the average basal LDH activities in perfusates obtained with the Gaddum cannula are not significantly different from those obtained using the slot design. The functionality of the tissues during perfusion with either one of these two probes was compared using the release of neurotransmitters as the index; also, only perfusion sessions where no major accidental damage occurred were used for this purpose. Figure 6 shows that the stimulated release and also the resting release of GABA and enkephalin were similar with the Gaddum and the slot cannulae after 5 hr of perfusion. Thus, in spite of the marked differences in the frequency of accidental lesions observed during perfusion with these two probes, the damage steadily produced during the perfusion, in the absence of accidents, was relatively small or limited to certain tissue elements so that quantitative differences in the functional parameters we measured cannot be detected. This is in contrast with the

effects of more extensive lesions produced by perfusion accidents which, as indicated before, impaired release processes. In summary, the slot cannula reduces the incidence of vascular accidents and flow occlusions occurring during a perfusion session, keeping the same tissue sampling efficiency of the traditional design. Consequently, the number of successful perfusion sessions is considerably increased. These improvements allowed us to carry out long perfusion sessions needed for the studies of biological rhythms which we later present.

## B. Neurobiological Applications

### 1. *IN VIVO* RELEASE OF ENKEPHALIN FROM THE GLOBUS PALLIDUS; RELATIONSHIP TO GABA-RELEASING SYSTEMS

The search for a model system to study the neurobiology of the enkephalins in the central nervous system (29) has led researchers to the striatum, which has one of the highest enkephalin concentrations in the brain (27, 58) and is also one of the few macroscopic regions of the brain where the chemically related endorphin systems are not present (2, 3, 9). Additionally, within the striatum, enkephalin perikarya and fibers are segregated: the globus pallidus is rich in fibers and terminals and all cell bodies are found in the caudo-putamen nucleus (4, 15). These advantages are exploited only in part when studying the release of enkephalin from the pallidum *in vitro* (1); the use of an *in vivo* preparation to study the charac-

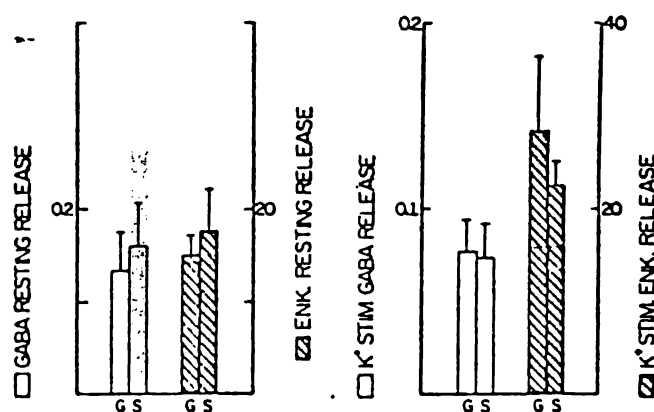


Fig. 6. Resting and stimulated release of exogenous GABA and endogenous enkephalin using the Gaddum (G) and slot (S) cannulae. In experiments to study  $^3\text{H}$ -GABA release its uptake was also measured: with perfusion of  $3.5 \times 10^6$  cpm of tritiated GABA the fraction remaining in the tissue after the washout period was  $28 \pm 5\%$  with the Gaddum cannula and  $29 \pm 6\%$  with the slot cannula. Results are the average of 6 experiments ( $\pm$  SEM).

teristics of enkephalin release takes advantage of the high density and anatomical segregation of enkephalin-containing terminals in the pallidum, while the integrity of pallidal connections with other brain regions is preserved. Previous studies have demonstrated that endogenous immunoreactive enkephalin is released *in vivo* from the globus pallidus; this release is calcium dependent and is enhanced during local or caudate nucleus stimulation (5, 7, 13) (see also Fig. 4, lower panel).

In order to understand the physiological mechanisms regulating the *in vivo* release of enkephalin in this model system, we have first studied the effects of putative transmitters present in the pallidum on the release of enkephalins. Since the globus pallidus is one of the brain region's richest in glutamate decarboxylase (21), we investigated the relationship between the GABA-containing system and the release of enkephalin in this area. Experiments were initially carried out in the globus pallidus of the cat because perfusion procedures are facilitated in larger species (6). Our present results have extended these studies to the rat, where neurochemical data are more abundant.

Figure 7 shows the effects of GABA and of the GABA-receptor antagonist picrotoxin on the pallidal release of enkephalin. The addition of GABA ( $10^{-4}M$ ) to the perfusing medium did not produce a measurable change in the resting enkephalin release (Fig. 7a), although it significantly inhibited the release stimulated by veratrine (Fig. 7b). In contrast, picrotoxin ( $5 \times 10^{-4}M$ ) had marked effects, increasing about threefold the resting release of enkephalin, both in the presence and in the absence of exogenous GABA (Fig. 7b and a, respectively). This effect of picrotoxin alone suggests that an endogenous GABAergic input tonically inhibits the *in vivo* release of enkephalin from the pallidum. Although in the experiment shown GABA ( $10^{-4}M$ ) could not inhibit the effect of picrotoxin ( $5 \times 10^{-4}M$ ), the increase in enkephalin release produced by lower concentrations of picrotoxin was blocked by millimolar concentrations of exogenous GABA, indicating that the picrotoxin effect is mediated by GABA receptors. In spite of the fact that these GABA receptor-mediated effects are initiated in the pallidum, the circuitry involved in regulating enkephalin release cannot be defined on this basis. However, since only enkephalin terminals, not cell bodies, are present in the pallidum, and this region is profusely innervated with glutamate decarboxylase-containing terminals (48), the simplest mechanism to explain this tonic inhibition is a presynaptic control of enkephalin release by GABA.

An inhibitory effect of GABA on enkephalin release had been previously shown using striatal slices (25). In this *in vitro* preparation, which includes the pallidal region, GABA inhibits the  $K^+$ -stimulated but not the resting release of enkephalin. Although this effect was blocked by picrotoxin, the

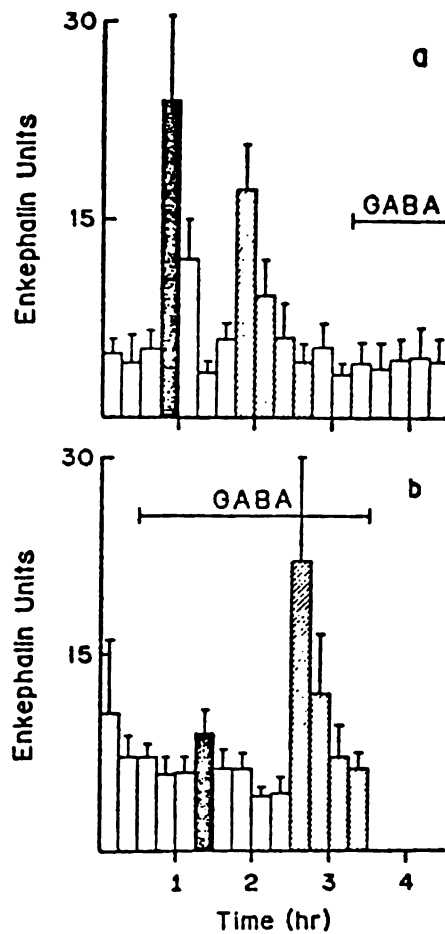


Fig. 7. Effect of GABA and picrotoxin on endogenous enkephalin release from the globus pallidus. Perfusions were conducted as described before but veratrine ( $60 \mu\text{g/ml}$ ) was used as the depolarizing agent to stimulate the release of enkephalin (black bars). Exogenous GABA ( $10^{-4} M$ ) added to the perfusing media is indicated by the horizontal lines. Picrotoxin ( $5 \times 10^{-4} M$ ) was present in the fractions represented by dashed bars. Results in each panel are the average  $\pm$  SEM of 4 perfusions.

latter had no effect by itself. This finding would be in accordance with our proposition if the tonic GABA inhibition on enkephalin release would not be present *in vitro*. In this respect it is worth noting that the leakage of enkephalin observed in slices of globus pallidus is not observed *in vivo* (1, 5, 7). *In vivo* perfusion studies on the regulation of enkephalin release in the striatal regions of the anesthetized cat (11) have also shown an inhibition by GABA of pallidal release of enkephalin. However, in these experiments biphasic effects were observed with GABA, muscimol, diazepam, and the antagonist picrotoxin: their initial effect was inhibitory but a rebound release

of enkephalin was observed after they were removed from the perfusion medium. We were not able to observe these biphasic drug effects in the freely moving rat; however, it is possible that the higher concentrations of GABA and picrotoxin we used—similar to those employed for the *in vitro* studies—revealed only in part the complexity of the effects of these drugs.

## 2. DIURNAL RHYTHM OF ENKEPHALIN *IN VIVO* RELEASE FROM THE GLOBUS PALLIDUS

Circadian rhythms and other periodic changes of the systems that produce or recognize endogenous opiates have already been documented (12, 18, 35, 36, 42, 46, 54, 56). Some of the early failures to observe circadian changes in opiate peptides were due to very restricted sampling schedules (14, 55). Since many of these opiate rhythms have already been linked to physiological, endocrinological, or behavioral changes, the search for oscillations of opiate-mediated communication in well-defined neural systems promises to shed some light on their functional roles.

In the course of our investigations on the regulation of the *in vivo* release of enkephalin from the globus pallidus of the rat it was observed that this release was consistently higher in the late afternoon and evening than in the morning hours. The analysis of resting enkephalin release levels at selected time intervals during morning and evening perfusion sessions showed a clear diurnal oscillation, the lowest levels being observed after noontime and increasing thereafter through the late evening hours (Fig. 8). Given the link previously established between the GABA and the enkephalin systems in the pallidum, we decided to study and compare possible diurnal variations in the *in vivo* release of these messengers in this region (8). The experimental protocols for *in vivo* perfusion were as those used in Fig. 4. Six perfusion sessions were carried out from 8:00 A.M. to 2:30 P.M. (daytime perfusions) and six from 4:00 P.M. to 10:30 P.M. (evening perfusions). Resting enkephalin release increased 100% between 2:00 P.M. and 10:00 P.M., while [<sup>3</sup>H]GABA resting release decreased by 60% (Fig. 9). This change in GABA resting release was not due to diurnal differences in uptake (Fig. 9). The release of [<sup>3</sup>H]GABA and enkephalin was also studied under depolarizing conditions (Fig. 10). The diurnal differences, already observed during resting release, were more marked after stimulation: between daytime and evening perfusions the K<sup>+</sup>-stimulated enkephalin release increased 6-fold while the K<sup>+</sup>-stimulated [<sup>3</sup>H]GABA release decreased more than 10-fold.

Other possible causes for these changes in transmitter release were considered early in this work and precautions were taken to follow the same

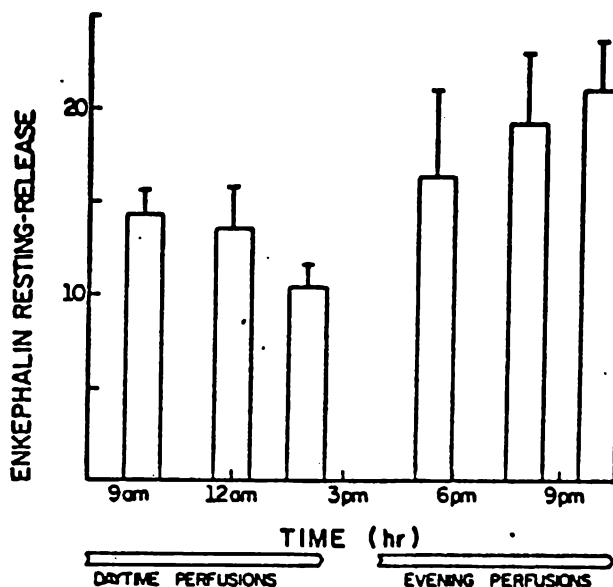


Fig. 8. *In vivo* resting enkephalin release from the rat globus pallidus during the course of daytime and evening perfusion sessions. Six perfusion sessions were carried out from 8:00 A.M. to 2:30 P.M. (daytime) and 6 from 4:00 P.M. to 10:30 P.M. (evening). In each perfusion the average resting release of enkephalin was determined at times close to the beginning, the middle, and the end of the session. Each value is the mean ( $\pm$  SEM) of the enkephalin contents in perfusate fractions collected during 1 hr. The resting enkephalin release values observed at the end of the daytime perfusions and at the end of the evening perfusions were significantly different ( $p < .05$ ).

experimental procedures during morning and evening sessions. Since Ces-selin *et al.* (13) reported that the enkephalin content and release in the globus pallidus of the cat was higher in the anterior portion than in the caudal part of this structure, the possibility that differences in the implanta-tion sites of rats perfused in the morning or in the evening could simulate a rhythm was analyzed. Our results indicated that there was no correlation between enkephalin or [ $^3$ H]GABA release and the localization of the can-nula tracks or the perfusion sites within the pallidum. The steady decrease in [ $^3$ H]GABA release observed during the course of a perfusion session (see Section III, A) was also considered when analyzing the perfusion data. Therefore, the comparison of resting and stimulated GABA release between morning and evening perfusions was made using perfusate fractions ob-tained with the same delay after the infusion of [ $^3$ H]GABA. Also, it was found that the uptake of [ $^3$ H]GABA (Fig. 9) and the fraction of radioactive tracer in the perfusates contributed by [ $^3$ H]GABA (see Section II) were not different in the morning and evening sessions, and therefore do not account

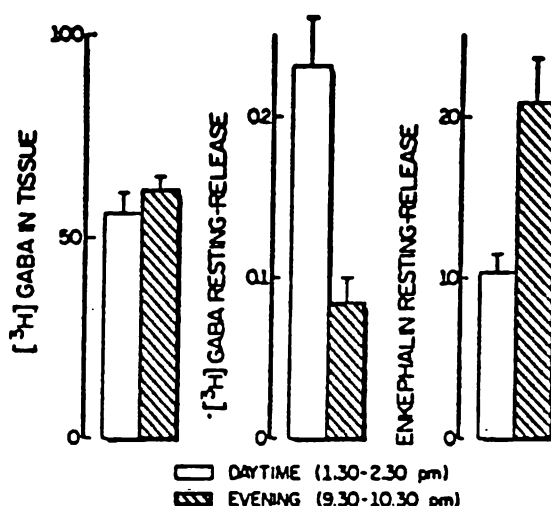


Fig. 9. Resting release of endogenous enkephalin and [<sup>3</sup>H]GABA between daytime and evening hours. The [<sup>3</sup>H] GABA uptake was similar between these hours (left panel). GABA release decreased significantly ( $p < .05$ ) between 2:00 P.M. and 10:00 P.M. (center panel). The enkephalin release between these times showed an opposite, statistically significant difference (right panel,  $p < .05$ ). Resting GABA and enkephalin release are defined as indicated in Fig. 4. Values are the average  $\pm$  SEM of 6 experiments.

for the rhythm observed. Nevertheless, it must be noted that since the GABA we measured is exogenous, the anatomical structures and the mechanisms involved in its release may differ from those participating in the release of endogenous GABA (32, 33, 53).

The diurnal rhythm observed in the release of enkephalin from the nerve terminals in the pallidum is not due to changes in the pallidal or caudate enkephalin content. Wesche and Frederickson (56) reported that in heat-stressed mice, but not in normal controls, the enkephalin levels, specifically in the globus pallidus, increased from 7:30 A.M. to 3:30 P.M. In our experiments the levels of enkephalin in the globus pallidus and in the caudate ( $5 \pm 1 \times 10^3$  units and  $2 \pm 0.2 \times 10^3$  units, respectively) were not significantly different at 8 A.M., 2 P.M. or 10 P.M., the lowest and highest points observed in the rhythm.

The diurnal rhythms in the release of enkephalin and GABA follow opposite patterns, suggesting the possibility of reciprocal controlling mechanisms. We have already presented evidence for the existence of an inhibitory GABAergic mechanism upon the release of enkephalin from the pallidum. No evidence is available of an influence of opiates on the GABA systems in this region. However, the complexity of the multiple opiate-GABA interactions in the striatum is already being documented. Moroni et al. (39, 40) have shown that an increased turnover of GABA is observed in



the pallidum after the administration of opiates in the caudate. This effect appears to be due to an opiate-mediated inhibition of striatal GABAergic neurons, which in turn activate GABA neurons in the caudo-pallidal pathway. Clearly, the efforts to understand the mechanisms of the oscillation of GABA and enkephalin release in the pallidum will have to go beyond the pallidal circuitry.

In relation to the functional role of these opposed diurnal rhythms of enkephalin and GABA release it is noteworthy that their actions in the globus pallidus also have opposite effects on the motor activity of the rat: bilateral injection of enkephalin analogs in the pallidum leads to hyperactivity, an action which is blocked by naloxone (31). In contrast, bilateral administration in the pallidum of drugs promoting GABAergic transmission produces akinesia and catalepsy, while the opposite is observed with drugs antagonizing this transmitter (47, 52). The increased enkephalin release and the decreased GABA release at night hours in the pallidum would lead to hyperactivity. Since the rat is a nightly active animal we suggest that the enkephalin-GABA transmission in the pallidum may be an important link in the neural control of the diurnal rhythms of motor activity in the rat.

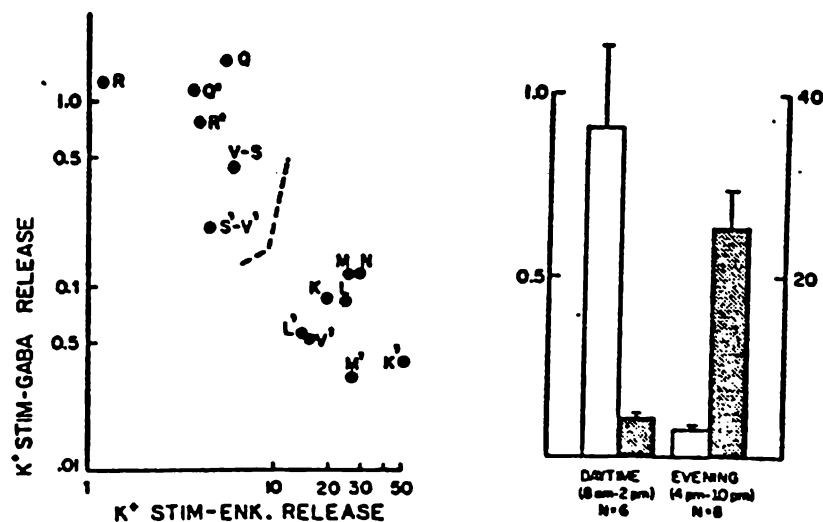


Fig. 10. K<sup>+</sup>-stimulated release of exogenous GABA and endogenous enkephalin from the globus pallidus in daytime and evening perfusion sessions. Left panel: Release values of these transmitters obtained in parallel are plotted in log-enkephalin vs log-GABA scales. Points above and to the left of the dashed lines correspond to individual data obtained from morning perfusions; points below and to the right of this line come from evening perfusions. Right panel: The same data are compared (in a linear scale) showing that the K<sup>+</sup>-stimulated GABA release (□) decreased 10-fold, while the enkephalin release (▨) increased 6-fold between the morning and the evening hours. Values are expressed as the mean ± SEM.

#### IV. PERSPECTIVES

Although recent developments allow the *in vivo* and *in situ* measurement of a gamut of substances in the brain, the stereochemical complexity of proteins and of most peptides demands highly specific and sensitive analysis, best performed in the assay tube. Furthermore, the enzymatic or biological activity of neural proteins can only be analyzed after these substances have been isolated from the brain. Although *in vivo* perfusion methods would have an important role in the future development of neurochemistry solely on this basis, the permanent need for these methods resides in their use within an old strategic approach: the identification of unknown substances released from the brain under physiological conditions. Some of the work presented here points in that direction.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. W. J. Shoemaker and Mrs. R. Azad-Fryer from the A. V. Davis Center of the Salk Institute for the preliminary tests of our anti-enkephalin sera. Synthetic enkephalins were a generous gift from Dr. N. Ling.

This work was supported in part by grants from CONACyT, México, Instituto Mexicano de Psiquiatría and Fondo de Estudios e Investigaciones, R. J. Zebada.

#### REFERENCES

1. Bayón, A., Rossier, J., Mauss, A., Bloom, F. E., Iversen, L. L., Ling, N., and Guillemin, R. *In vitro* release of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin from the rat globus pallidus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (1978) 3503–3506.
2. Bayón, A., Shoemaker, W. J., Bloom, F. E., Mauss, A., and Guillemin, R. Perinatal development of the endorphin and the enkephalin-containing systems in the rat brain. *Brain Res.* 179 (1979) 93–101.
3. Bayón, A., Koda, L., Battenberg, E., Azad, R., Guillemin, R., and Bloom, F. E. Regional distribution of endorphin, methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the pigeon brain. *Neurosci. Lett.* 16 (1980) 75–80.
4. Bayón, A., Koda, L., Battenberg, E., and Bloom, F. E. Redistribution of endorphin and enkephalin immunoreactivity in the rat brain and pituitary after *in vivo* treatment with colchicine or cytochalasin B. *Brain Res.* 183 (1980) 103–111.
5. Bayón, A., Drucker-Colín, R., Lugo, L., Shoemaker, W. J., Azad, R., and Bloom, F. E. Enkephalin release from the globus pallidus: *In vitro* and *in vivo* studies. In "Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission," (R. Tapia and W. Cotman, eds.), 1981, pp 29–41. Plenum, New York.
6. Bayón, A., Drucker-Colín, R., Lugo, L., Shoemaker, W. J., Azad, R., and Bloom, F. E. *In vivo* release of enkephalin from the globus pallidus is tonically inhibited by endogenous GABA. *Soc. Neurosci. Abstr.* 7 (1981) 800.

7. Bayón, A., Shoemaker, W. J., Lugo, L., Azad, R., Ling, N., Drucker-Colín, R., and Bloom, F. E. *In vivo* release of enkephalin from the globus pallidus. *Neurosci. Lett.* 24 (1981) 65–70.
8. Bayón, A., Anton, B., and Díaz-Pontones, D. *In vivo* enkephalin release from the globus pallidus of the rat; diurnal rhythm and relationship with GABA-releasing systems. *Soc. Neurosci. Abstr.* 9 (1983) 588.
9. Bloom, F., Battenberg, E., Rossier, J., Ling, N., and Guillemin, R. Neurons containing  $\beta$ -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (1978) 1591–1595.
10. Bergmeyer, H. U. "Methods of Enzymatic Analysis" (2nd edition), Vol. 2, 1974, pp. 574–579. Academic Press, New York.
11. Bourgoin, S., Cesselin, F., Artaud, F., Glowinski, J., and Hamon, M. *In vivo* modulation by GABA-related drugs of Met-enkephalin release in basal ganglia of the cat brain. *Brain Res.* 248 (1982) 321–330.
12. Campos, A. E., Luján, M., López, E., Figueroa-Hernández, J. L., and Rodríguez, R., Circadian variation in the lethal effect of morphine in the mouse. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 26 (1983) 101–103.
13. Cesselin, F., Soubrie, P., Bourgoin, S., Artaud, F., Reisine, T. D., Michelot, R., Glowinski, J., and Hamon, M. *In vivo* release of Met-enkephalin in the cat brain. *Neuroscience* 6 (1981) 301–313.
14. Childers, S. R., and Snyder, S. H. Diurnal variation, post-mortem degradation and effect of cycloheximide. In "Endorphins in Mental Health Research," (E. Usdin, W. E. Bunney, and N. S. Kline, eds.), 1979, pp. 181–188. Macmillan, London.
15. Cuello, A. C., and Paxinos, S. G. Evidence for a long Leu<sup>5</sup>-enkephalin strio-pallidal pathway in rat brain. *Nature (London)* 271 (1978) 178–180.
16. Drucker-Colín, R. Endogenous sleep peptides. In "Psychopharmacology of Sleep," (D. Wheatley, ed.), 1981, pp. 53–72. Raven, New York.
17. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.
18. Frederickson, R. C. A., Burgis, V., and Edwards, J. Hyperalgesia induced by naloxone follows diurnal rhythm in responsivity to painful stimuli. *Science* 198 (1977) 756–758.
19. Fricke, U. Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton-X-100. *Anal. Biochem.* 63 (1975) 555–558.
20. Gaddum, J. H. Push-pull cannulae. *J. Physiol. (London)* 155 (1961) 1–2.
21. Gottesfeld, Z., and Jacobowitz, D. M. Neurochemical and anatomical studies of GABAergic neurons. In "Interactions between Putative Neurotransmitters in the Brain," (S. Garattini, J. Pujol, and R. Samanin, eds.), 1978, pp. 109–126. Raven, New York.
22. Greenfield, S., Cheramy, A., Leviel, V., and Glowinski, J. *In vivo* release of acetylcholinesterase in the cat substantiae nigrae and caudate nuclei. *Nature (London)* 284 (1980) 355–357.
23. Greenfield, S., Cheramy, A., and Glowinski, J. Evoked release of proteins from central neurons *in vivo*. *J. Neurochem.* 40 (1983) 1048–1057.
24. Hamberger, A., Berthold, C.-H., Jacobson, I., Karlsson, B., Lehmann, A., Nyström, B., and Sandberg, M. *In vivo* brain dialysis of extracellular nontransmitter and putative transmitter amino acids. This volume, Chapter 8.
25. Herz, A., Duka, T., Gramsch, C., Höllt, V., Osborne, H., Przewlocki, R., Schultz, R., and Wüster, M. Pharmacologic manipulation of brain and pituitary endorphin content and release. In "Neural Peptides and Neuronal Communication," (E. Costa and M. Trabucchi, eds.), 1980, pp. 323–333. Raven, New York.

26. Hofstein, R., Hesse, G., and Shashoua, V. E. Proteins of the extracellular fluid of mouse brain: extraction and partial characterization. *J. Neurochem.* **40** (1983) 1448–1455.
27. Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Terenius, L. and Stein, L. The distribution of enkephalin immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system. *Neurosci. Lett.* **5** (1977) 25–31.
28. Honchar, M. P., Hartman, B. K., and Sharpe, L. G. Evaluation of *in vivo* brain site perfusion with the push–pull cannula. *Am. J. Physiol.* **236** (1979) R45–56.
29. Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. H., Morgan, B. A., and Morris, H. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature (London)* **255** (1975) 577–579.
30. Iijima, T., and Nunoki, K. Superfusion and electrical stimulation of the canine brain with a push–pull cannula. This volume, Chapter 4.
31. Joyce, E. M., Koob, G. F., Strecker, R., Iversen, S. D., and Bloom, F. E. The behavioural effects of enkephalin analogs injected into the ventral tegmental area and globus pallidus. *Brain Res.* **221** (1981) 359–370.
32. Kemel, M. L., Gauchi, C., Glowinski, J., and Besson, M. J. Spontaneous and potassium evoked release of  $^3\text{H}$ -GABA newly synthesized from  $^3\text{H}$ -glutamine in slices of the rat substantia nigra. *Life Sci.* **24** (1979) 2139–2150.
33. Kondo, Y., and Iwatsuro, K. Increased release of preloaded ( $^3\text{H}$ )GABA from substantia nigra *in vivo* following stimulation of caudate nucleus and globus pallidus. *Brain Res.* **154** (1978) 395–400.
34. Konig, J. F. R., and Klippel, R. A. "The Rat Brain," 1967, 162 pp. Krieger, New York.
35. Kumar, M. S. A., Chen, C. L., and Muther, T. F. Changes in pituitary and hypothalamic content of Met-enkephalin during the estrous cycle of rats. *Life Sci.* **25** (1979) 1687–1696.
36. Kumar, M. S. A., Chen, C. L., Sharp, D. C., Liu, J. M., Kalra, P. S., and Kaira, S. R. Diurnal fluctuation in methionine-enkephalin levels in the hypothalamus and preoptic area of the male rat: effects of pinealectomy. *Neuroendocrinology* **35** (1982) 28–31.
37. Lajtha, A. H. "Handbook of Neurochemistry" (2nd edition), Vol. 4, Enzymes in the Nervous System. 1983, 549 pp. Plenum, New York.
38. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265–275.
39. Moroni, F., Cheney, D. L., Peralta, E., and Costa, E. Opiate receptor agonists as modulators of  $\gamma$ -amino butyric acid turnover in the nucleus caudatus, globus pallidus and substantia nigra of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **207** (1978) 870–877.
40. Moroni, F., Peralta, E., Cheney, D. L., and Costa, E. On the regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid neurons in caudatus, pallidus and nigra: effects of opioids and dopamine agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208** (1979) 190–194.
41. Myers, R. D. An improved push–pull cannula system for perfusing an isolated region of the brain. *Physiol. Behav.* **5** (1970) 243–246.
42. Naber, D., Cohen, R. M., Picker, D. X., Kline, W. H., Davis, G., Pert, C. B., and Bunney, W. E., Jr. Episodic secretion of opioid activity in human plasma and monkey CSF: evidence for a diurnal rhythm. *Life Sci.* **28** (1981) 931–935.
43. Neouillon, A., Cheramy, A., and Glowinski, J. An adaptation of the push–pull cannula method to study the *in vivo* release of ( $^3\text{H}$ )dopamine synthesized from ( $^3\text{H}$ )tyrosine in rat caudate nucleus: effect of various physical and pharmacological treatments. *J. Neurochem.* **28** (1977) 819–828.
44. Philippu, A. The use of push–pull cannulae for superfusing various hypothalamic areas in anesthetized and conscious freely moving animals. This volume, Chapter 13.
45. Philippu, A., Przuntek, H., and Roensberg, W. Superfusion of the hypothalamus with

- gamma-aminobutyric acid: effect on the release of noradrenaline and blood pressure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 276 (1973) 103–118.
46. Przewlocki, R., Lason, W., Konecka, A. M., Gramsch, C., Herz, A., and Reid, L. D. The opioid peptide dynorphin, circadian rhythms and starvation. *Science* 219 (1983) 71–73.
  47. Pycoc, C., Horton, R. W., and Marsden, C. D. The behavioural effects of manipulating GABA function in the globus pallidus. *Brain Res.* 116 (1976) 353–359.
  48. Ribak, C. E. The GABAergic neurons of the extrapyramidal system as revealed by immunocytochemistry. In "GABA and the Basal Ganglia," (G. DiChiara and G. L. Gessa, eds.), 1981, pp. 23–36. Raven, New York.
  49. Rinderknecht, H., Geokas, M. C., Silverman, P., and Haverback, B. J. A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chim. Acta* 21 (1968) 197–203.
  50. Rossier, J., Bayón, A., Vargo, T. M., Ling, N., Guillemin, R., and Bloom, F. E. Radioimmunoassay of brain peptides: evaluation of a methodology for the assay of  $\beta$ -endorphin and enkephalin. *Life Sci.* 21 (1977) 847–852.
  51. Sandoval, M. E., Torner, C. A., and Medrano, L. High affinity uptake and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent release of glutamic acid in the developing cerebellum. *Neuroscience* 11 (1984) 867–875.
  52. Scheel-Krüger, J., Magelund, G., and Olanas, M. C. Role of GABA in the striatal output system: globus pallidus, nucleus entopeduncularis, substantia nigra and nucleus subthalamicus. In "GABA and the Basal Ganglia," (G. DiChiara and G. L. Gessa, eds.), 1981, pp. 165–186. Raven, New York.
  53. van der Heyden, J. A. M., Venema, K., and Korf, J. *In vivo* release of endogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid from rat striatum: effects of muscimol, oxotremorine and morphine. *J. Neurochem.* 34 (1980) 1648–1653.
  54. von Knorring, L., Almay, B. G. L., Johansson, F., Terenius, L., and Wahlstrom, A. Circannual variation in concentrations of endorphins in cerebrospinal fluid. *Pain* 12 (1982) 265–272.
  55. Wesche, D. L., and Frederickson, R. C. A. Diurnal differences in opioid peptide levels correlated with nociceptive sensitivity. *Life Sci.* 24 (1979) 1861–1868.
  56. Wesche, D. L., and Frederickson, R. C. A. Diurnal rhythm in response to noxious stimuli—increase of Met-enkephalin in globus pallidus. In "Advances in Endogenous and Exogenous Opioids" (Proc. Int. Narcotic Res. Conf.), 1981, pp. 232–234. Kodansha, Tokyo.
  57. Yaksh, T. L., and Yamamura, H. I. Factors affecting performance of the push-pull cannula in brain. *J. Appl. Physiol.* 37 (1974) 428–434.
  58. Yang, H.-Y., Hong, J. S., and Costa, E. Regional distribution of Leu- and Met-enkephalin in the rat brain. *Neuropharmacology* 16 (1977) 303–307.

PUBLICACION

II

# Release of Proteins, Enzymes, and the Neuroactive Peptides, Enkephalins, from the Striatum of the Freely Moving Rat<sup>a</sup>

ALEJANDRO BAYÓN,<sup>b,c</sup> BENITO ANTÓN,<sup>c</sup>  
PHILIPPE LEFF,<sup>b</sup> AND SARA SOLANO<sup>c</sup>

<sup>b</sup> *Instituto de Investigaciones Biomédicas*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*  
*Apartado Postal 70228*  
*04510 México, D. F.*

and

<sup>c</sup> *Instituto Mexicano de Psiquiatría*  
*Secretaría de Salud*  
*Calzada México-Xochimilco 101*  
*Tlalpan, México, D. F.*

## INTRODUCTION

This paper deals with the *in vivo* release of proteins, enzymes, and peptides from the brain. These substances have been shown to be released from the nervous tissue and their possible roles in neural communication are a subject of increasing interest in neurobiology. Current evidence indicates that their availability at the release sites has a close dependence on the entire structure of the neuron, thus differing from nonpeptide messengers whose metabolism is mostly centered on the synaptic apparatus. Therefore, it seems to be particularly important to study peptide and protein release in integral neural pathways and circuits.

These studies are possible through the *in vivo* perfusion of deep brain nuclei, a technique that requires reliable probes and pressure buffering systems. We have designed a push-pull cannula with a slotted tip that, used with a pumping system open to the atmospheric pressure, minimizes the damage to the tissue and reduces flow obstructions during perfusion. This perfusion system has been tested using the release of proteins, peptides, and non-peptide transmitters as biochemical markers to assess tissue damage and viability. In this context, we present data on the *in vivo* release of protein material and several enzyme activities from the striatum, this release being induced by mechanical means or by chemical depolarization. We also give evidence

<sup>a</sup>Supported in part by grants from CONACYT, Mexico, Instituto Mexicano de Psiquiatría and Fondo de Estudios e Investigaciones, R. J. Zebada.

of the *in vivo* release of the neuropeptides enkephalins, presenting results on the physiological regulation of this release in freely moving animals.

## METHODS

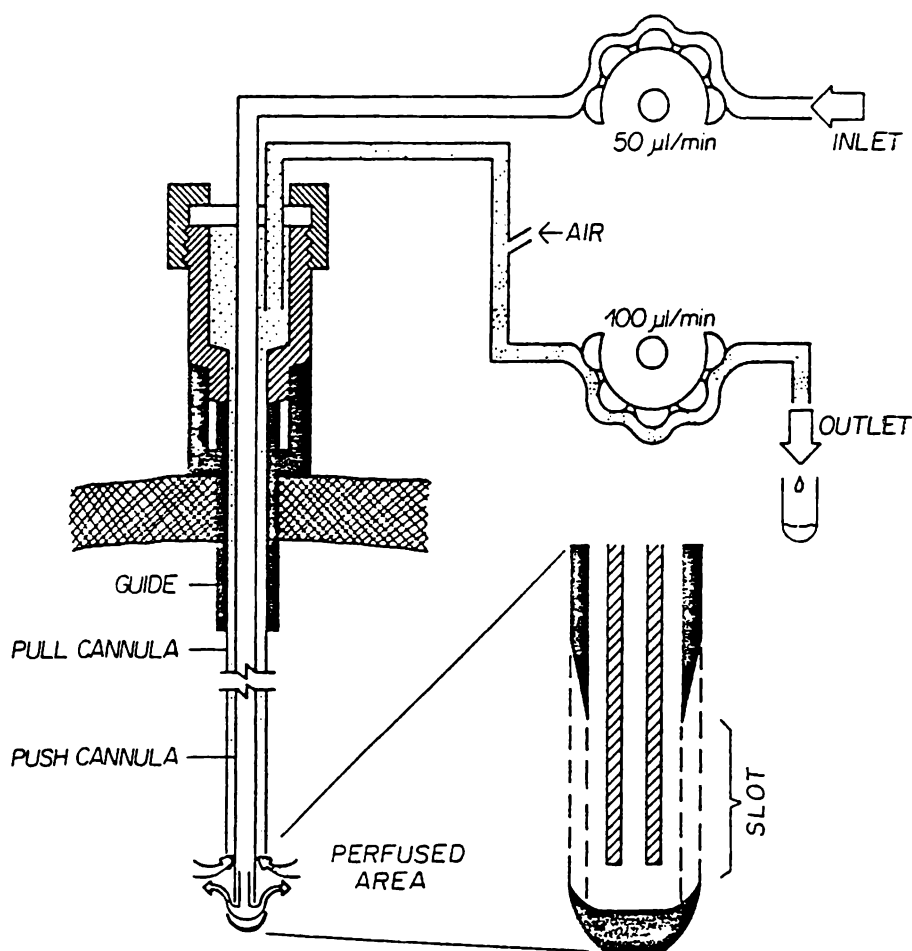
### *Cannula*

The basic design of the push-pull cannula used in these experiments is that of Gaddum,<sup>1</sup> as adapted by Myers.<sup>2</sup> Early work with this cannula in our laboratory gave a relatively high incidence of flow obstructions during perfusion, which were found to be due to the presence of tissue fragments or clogs obliterating the tip or the shaft of the pull part of the cannula. These obstructing materials are produced mainly by negative pressures developed at the perfused region and by the tissue-eroding effect of the stream of superfusing medium. The former effect is mostly dependent on the pressure balance of the pumping systems and can be successfully dealt with using a pull line open to the atmospheric pressure (FIGURE 1).<sup>3</sup> The erosion depends mainly on the geometry of the cannula tip and has been minimized by keeping the end of the inner push cannula within the outer pull tubing.<sup>4-6</sup> Although this type of design shields the tissue from the direct mechanical effects of the outflowing stream, it reduces the diffusion interface at the cannula tip to the size of the cross-sectional area of the outer cannula, making it necessary to use wider probes that are unsuitable for small laboratory animals. We have designed a new cannula tip (FIGURE 1) that besides providing the shielding effect previously noted, allows for a larger interface between the tissue and the perfusing medium, even using small-gauge cannulae. The push-pull cannula is constructed from 21-ga (thin wall) and 29-ga stainless-steel tubing (Small Parts Inc., Miami, FL). Before assembling the outer and inner tubings to form a concentric Gaddum-Myers system, the 21-ga pull tubing is obstructed at the tip with soldering material and two slots are drilled under microscopic control on the sides of the shaft, just above the tip.

### *Surgery*

Albino rats (local Wistar strain) weighing 150-200 g were anesthetized with sodium pentobarbital. Surgery, under aseptic conditions, is limited to the stereotaxic implantation of a stainless-steel 18-ga cannula, which is chronically fixed with acrylic cement to the skull, serving as a guide for the acute insertion of the push-pull cannula (FIGURE 1). The lower end of the guide cannula is placed several millimeters above the brain region that will be reached by the tip of the push-pull cannula at the time of perfusion; this strategy avoids the gliosis found in the perfused area when the perfusing probe itself is chronically implanted into the brain.<sup>7</sup> The upper end of the guide cannula (FIGURE 1) was modified by adding a clamping device to impede rotational or axial movements of the push-pull cannula after it is inserted; a tight fit between the outer pull cannula and the guide avoids other movements of the probe. After implantation, the lumen of the guide is temporarily blocked with a tight-fitting rod until the day





**FIGURE 1.** Push-pull perfusion system. The basic design of the cannula is that of Gaddum-Myers. The inlet (white) and outlet (dotted) tubing systems are concentric along the shaft of the cannula but separate after entering the upper chamber, which is constructed of two stainless-steel screwed pieces (dashed) and a rubber septum (white). The guide cannula used in our laboratory incorporates a clamping device (black) to fix the push-pull cannula. The inset shows the slotted tip (longitudinal section) of the push-pull cannula used in this work. The pumping system is open to the atmospheric pressure (air inlet = 0.5 mm diam.); the speed of the out-flow pump is set to double the speed of the inflow.

of perfusion (1 week after surgery). During this time the implant is protected by a plastic cap covering the guide. The coordinates used for the globus pallidus and other brain regions were taken from the atlas of König and Klippel.<sup>8</sup>

#### *Perfusion Procedure*

Implanted animals were placed in transparent plastic cages—their usual housing—in a quiet, isolated room 2 hr before the beginning of the session and remained in a freely moving situation throughout the perfusion. The animals were subjected to a single perfusion session. The protective mandrel was removed from the guide and the perfusing cannula slowly inserted and clamped in place. During early work in our laboratory the push and the pull ends of the cannulae were connected through polyethylene tubing to infusion and withdrawal syringes positioned in a Harvard reciprocating pump.<sup>9,10</sup> Currently, a continuous superfusion system open to the atmospheric pressure has been adopted, using small-bore, thick-wall Silastic tubing and polystaltic cassette pumps (Manostat) (FIGURE 1).

The standard perfusion medium is a Krebs-Ringer bicarbonate buffer: 127 mM NaCl, 3.73 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, *d*-glucose 2 g/liter. Bovine serum albumin (BSA) (0.1%), and bacitracin (30 μg/ml) were included in the medium as protective agents for enkephalin release studies.<sup>11</sup> Chemical stimulation of the perfused tissue was produced by substituting K<sup>+</sup> for Na<sup>+</sup> ions in the standard medium to reach a 50 mM K<sup>+</sup> concentration. From the onset the flow rate was held constant (25 μl/min or 50 μl/min, the effluent fractions being collected at 15 min or 4 min intervals, respectively, see figure legends). During the experiments, infused and collected fluid volumes were routinely measured and there was constant monitoring for the presence of blood in the effluent. Abnormal animal behavior (motor disturbances, persistent drowsiness, hyperactivity, excessive grooming, salivation, etc.) was also recorded. At the end of the perfusion, the position of the tip of the cannula was verified by inspection of frontal sections of the brain under a dissection microscope.

During the study of enkephalin release into the effluent medium, fractions were collected in plastic tubes containing 0.5 ml of 2.0 N ice-cold acetic acid in order to stop enzymatic degradation; these fractions were then boiled for 15 min, lyophilized, and resuspended in phosphate saline buffer for the enkephalin radioimmunoassay (RIA). When release of protein, enzyme activities, or radioactive tracers was studied, the perfusate fractions were aliquoted, frozen, and promptly assayed.

#### *Assay of Biological Samples*

Protein release was determined by the method of Lowry *et al.*,<sup>12</sup> using BSA as the standard; the reaction volume was reduced and the sample volume increased in order to improve the sensitivity of the assay. In some experiments protein was also measured using the method of Bradford.<sup>13</sup> Lactic acid dehydrogenase (LDH) activity was determined using pyruvate as substrate.<sup>14</sup> Also, in order to increase the sensitivity of the assay, incubation volume was reduced, sample volume increased, and reaction time extended to 24 hr. When assaying perfusate samples with low LDH activities

the initial velocities were linear for at least 12 hr and plots of enzyme concentration versus reaction velocity gave straight lines. Similar assay modifications also produced higher sensitivities when measuring acetylcholinesterase (AChE) (using acetylthiocholine iodide as substrate<sup>13</sup>) and protease activities (Hide powder azure as substrate<sup>16</sup>). Units of enzyme activity are expressed in nanomoles of substrate/hr. Only protease activity is expressed in absorbance units/24 hr.

In order to study the release of exogenous GABA, tritiated  $\gamma$ -aminobutyric acid (<sup>3</sup>H]GABA, specific activity 34 Ci/mmol, Amersham) was added to the standard perfusion medium at the beginning of the perfusion ( $4-20 \times 10^6$  cpm in 750  $\mu$ l, perfused in 30 min). The [<sup>3</sup>H]GABA and metabolites not retained or taken up by the tissue were washed out during the 1-2 hr that followed. During this process and

TABLE 1. Biochemical Parameters of Tissue Damage and Tissue Viability during Perfusion<sup>a</sup>

	LDH	Protease	AChE	Protein	Enkephalin	[ <sup>3</sup> H]GABA
Globus Pallidus						
Depolarization induced release	105 $\pm$ 23	125 $\pm$ 25	134 $\pm$ 14	250 $\pm$ 62	235 $\pm$ 45	160 $\pm$ 30
Mechanically induced release	2010 $\pm$ 616	216 $\pm$ 65	284 $\pm$ 113	1700 $\pm$ 580	*	*
Caudate Putamen						
Depolarization induced release	114 $\pm$ 16	108 $\pm$ 19	240 $\pm$ 60	275 $\pm$ 24		-
Mechanically induced release	1870 $\pm$ 720	156 $\pm$ 18	660 $\pm$ 400	2500 $\pm$ 600	-	-

<sup>a</sup>Release was induced by depolarization with 50 mM K<sup>+</sup> in the perfusing medium or, mechanically, by withdrawal and reinsertion of the push-pull cannula. Data are expressed as %  $\pm$  variation coefficient ( $N = 4$ ) of the resting release values. In the globus pallidus these control values (per ml of perfusate) were: LDH, 6.5  $\pm$  2.7 units; proteases, 12  $\pm$  1 units; AChE, 2.6  $\pm$  0.4 units, and protein, 30  $\pm$  4  $\mu$ g. In the caudate putamen resting values were: LDH, 16.0  $\pm$  4.2 units; proteases, 12.5  $\pm$  2.0 units; AChE, 5.0  $\pm$  0.9 units, and protein, 60  $\pm$  20  $\mu$ g.

<sup>b</sup>Enkephalin and [<sup>3</sup>H]GABA release are increased to highly variable extents after acute mechanical lesions but, in contrast to the enzyme markers, subsequent release in response to depolarization is impaired.

throughout the rest of the perfusion, 10  $\mu$ l aliquots from each collected fraction were counted in tritosol<sup>17</sup> to determine the resting and the evoked release of [<sup>3</sup>H]GABA. The fraction of the tritiated material in the perfusates that was contributed by [<sup>3</sup>H]GABA was determined by analysis of the samples in ion-exchange chromatography, followed by TLC.<sup>18</sup> In spite of the fact that no inhibitor of GABA metabolism was added to the perfusing media, 60% of the tracer released during the third hour of perfusion was GABA. This proportion was reduced to 30% after the sixth hour. When release was evoked by depolarization, the fraction of counts coeluting with GABA was more than 50% higher than that found in perfusates obtained during resting conditions. Since these ratios remained constant in the different experimental conditions presented in this work, release data were calculated from uncorrected total counts per minute in the perfusate fractions.

The release of endogenous immunoreactive enkephalin was determined by RIA. In addition to the Leu-enkephalin RIA that we have previously reported,<sup>9,10,19</sup> two new assays have been developed and used. Glutaraldehyde conjugates of BSA-Met-enkephalin and BSA-Leu-enkephalin were purified by gel filtration and emulsified in complete Freund's adjuvant. Antisera were raised in rabbits during a 3-month immunization schedule. Either <sup>125</sup>I- or <sup>3</sup>H-labeled enkephalins were used as tracers and the free and bound enkephalins were separated with activated charcoal-dextran suspensions. When a final antiserum dilution of 1:1500 was used, the lowest detectable amounts of unlabeled enkephalins were 10-50 pg using <sup>3</sup>H-labeled tracers, and 2-5 pg using <sup>125</sup>I-labeled tracers. Leu-enkephalin cross-reacts 8% in the Met-enkephalin assay and Met-enkephalin cross-reacts 0.3% in the Leu-enkephalin assay; enkephalin fragments and endorphins cross-react less than 0.1% in the Met-enkephalin assay and less than 0.001% in the Leu-enkephalin assay. Both the Met- and the Leu-enkephalin assays have been validated with tissue samples. In order to facilitate the comparison of the results presented here with previous reports from our laboratory, we show only the data obtained with Leu-enkephalin RIAs; nevertheless, similar results were obtained using a Met-enkephalin assay. Since the Leu-enkephalin RIAs also read Met-enkephalin, an "enkephalin unit" has been defined: it is the enkephalin immunoreactive material that produces a displacement of tracer in the assay equal to that observed with one picogram of synthetic Leu-enkephalin.<sup>19</sup> All perfusate samples were assayed at two dilutions and in duplicate.

## RESULTS

### *Release of Protein, Lactate Dehydrogenase, Proteases, Acetylcholinesterase, [<sup>3</sup>H]GABA, and Enkephalins as Biochemical Markers of Tissue Viability during in Vivo Push-Pull Perfusion of the Striatum*

The need to assess the effect of perfusion on tissue viability has been fulfilled by using histological or electrophysiological controls of damage and functionality. However, it is often overlooked that biochemical markers released in the perfusate can give information on the tissue damage occurring during a perfusion session.<sup>20,21</sup> Biochemical measurements also help to assess the functionality of the tissue during the course of a perfusion session, testing its capability for releasing exogenous and endogenous neurotransmitters. Thus, we have explored the suitability of several enzyme activities, total protein material, and representative peptide (enkephalin) and nonpeptide (GABA) transmitters as biochemical indicators of tissue damage and tissue responsiveness during *in vivo* perfusion of striatal regions. This study aims to differentiate substances that are only released after tissue damage from those that can be released through physiological mechanisms, placing special emphasis on enzymes and proteins. Later on, we describe how this information was used to compare the performance of the Gaddum cannula to that of a modified probe designed in our laboratory. Finally, we show results obtained with this cannula, regarding the physiological regulation of the release of messengers in the striatum.

Protein release into perfusates has been used earlier as a lesion marker.<sup>21</sup> Since protein is always present in perfusates (because its normal level in the extracellular fluid of the nervous tissue is high<sup>22,23</sup>) only marked surges of protein in perfusates

have been used as indicators of tissue damage. LDH is a soluble cytoplasmic enzyme, also normally found in plasma, which is the most widely used marker of tissue damage both in biochemistry and in clinical medicine. Its level in perfusates is expected to increase as a consequence of cell lysis (by tissue erosion or by accidental mechanical damage) or after extravasation of serum (by edema or by rupture of capillaries). Proteolytic activity, mainly associated with lysosomes, and AChE activity, mostly membrane bound (but some soluble intracellularly, and also present in blood), would also be expected to increase in perfusates after severe tissue disruption.<sup>24</sup> However, increases in these markers produced by causes other than tissue lesions cannot be discarded *a priori*. TABLE 1 shows that high  $K^+$  concentrations stimulate the release of protein both in the globus pallidus and in the caudate putamen of the rat and, only in the caudate, the release of AChE activity. Depolarization-induced release of LDH or protease activities was not observed. In contrast, mechanical damage elicited an increased release of all four substances in the caudate and in the pallidum. It is worth noting that the mechanically induced release was always higher than that evoked by depolarization.

The results presented here indicate that LDH activity and, less conspicuously, protease activity can be used as reliable markers of tissue damage during push-pull perfusion. This is not so for protein and AChE activity: Greenfield *et al.*<sup>25,26</sup> had already shown that protein and AChE activity are released after chemical depolarization from the substantia nigra and the caudate nucleus in the anesthetized cat. Our results confirm and extend these observations to the caudate-pallidal region in the freely moving rat. We have further explored the release of protein from the brain, since the constituents of this material are still unknown and will surely have neurobiological relevance. The chemical identity of these proteins has been confirmed by the fact that they can be detected in polyacrylamide gels through a silver stain (not shown), and can be measured both by the Lowry and the Bradford methods, which work on different principles (FIGURE 2). In addition, their release can be evoked by systemic administration of subconvulsant doses of metrazol (FIGURE 3), indicating that the protein release induced by  $K^+$  is not likely to be artifactual—i.e. due to  $K^+$  ionic strength. Moreover, this release is at least partially dependent on the presence of external  $Ca^{2+}$  (FIGURE 4). This observation is in contrast with that reported by Greenfield *et al.*—who did not use EGTA to chelate endogenous  $Ca^{2+}$ <sup>26</sup>—and suggests that part of this protein could be released through well known secretion mechanisms. Although the origin of these proteins released from the brain by chemical stimulation is not yet clear, preliminary experiments (Oksenberg *et al.*, in preparation) indicate that at least some of them can be synthesized from labeled precursors injected in the striatum. Thus, protein substances, first used as lesion markers, have become the subjects of neurobiological inquiries regarding their possible roles in neurochemical signaling.

The ability to detect damage occurring during *in vivo* perfusions is not enough for validating the use of a particular perfusion system; tests of the functionality of the preparation during perfusion are required to assess the value of these techniques. The ability of the tissue to release chemical transmitters can be used for this purpose. FIGURE 5 shows the resting and the stimulated *in vivo* release of [ $^3$ H]GABA and endogenous enkephalins, the two transmitters known to be most abundant in the globus pallidus of the rat.<sup>27,28</sup> As described in METHODS, after a washout period the release of tritiated GABA was evoked by high  $K^+$  concentrations in the perfusing medium, repeated stimulations releasing lower amounts of tracer (FIGURE 5, upper panel). This decrease can be related to the metabolism of [ $^3$ H]GABA and its exhaustion in the tissue pools (see METHODS) and does not reflect progressive tissue change. This conclusion is supported by the observation that a stable evoked release of endogenous

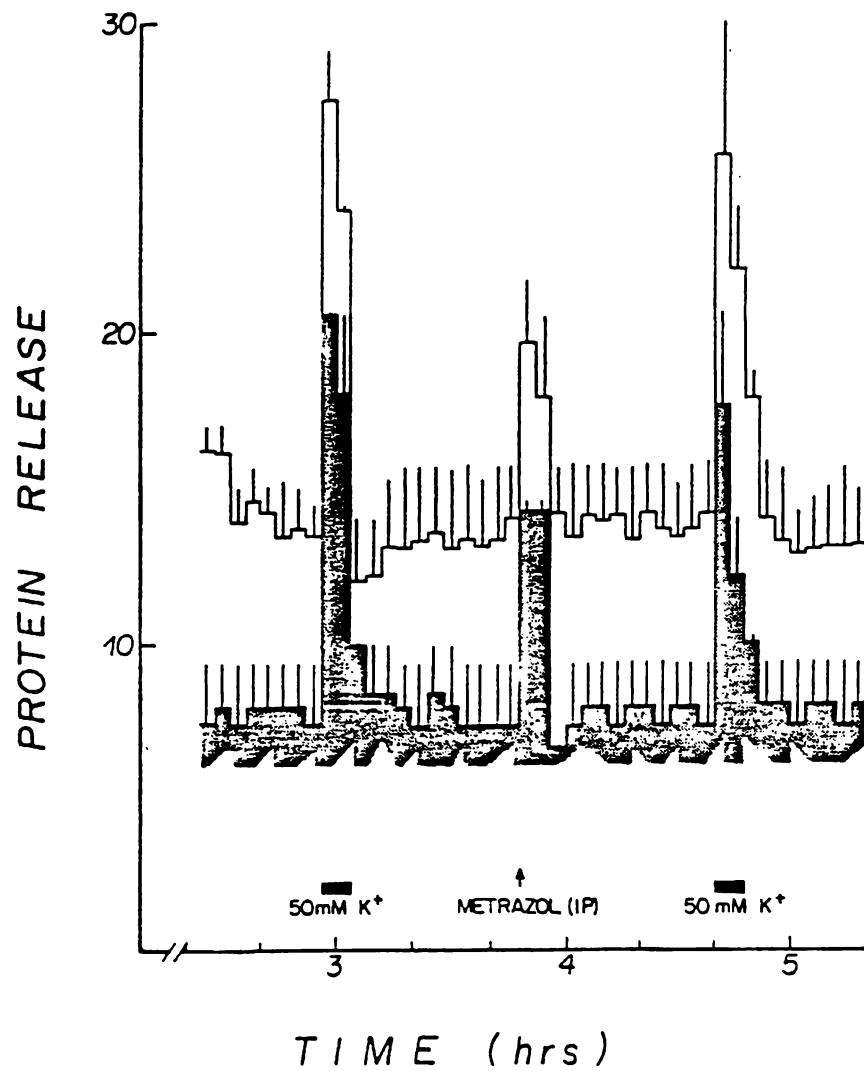


FIGURE 2. *In vivo* release of protein from rat brain as estimated by the methods of Lowry and Bradford. Animals were perfused in the globus pallidus using a flow rate of  $50 \mu\text{l}/\text{min}$ ; fractions were collected at 4 min intervals (Treatments during perfusion are described in FIGURE 3). Protein content in perfusates was determined both by the methods of Lowry ( $\square$ ) and Bradford ( $\blacksquare$ ) and is expressed in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (mean  $\pm$  interval,  $N = 2$ ).

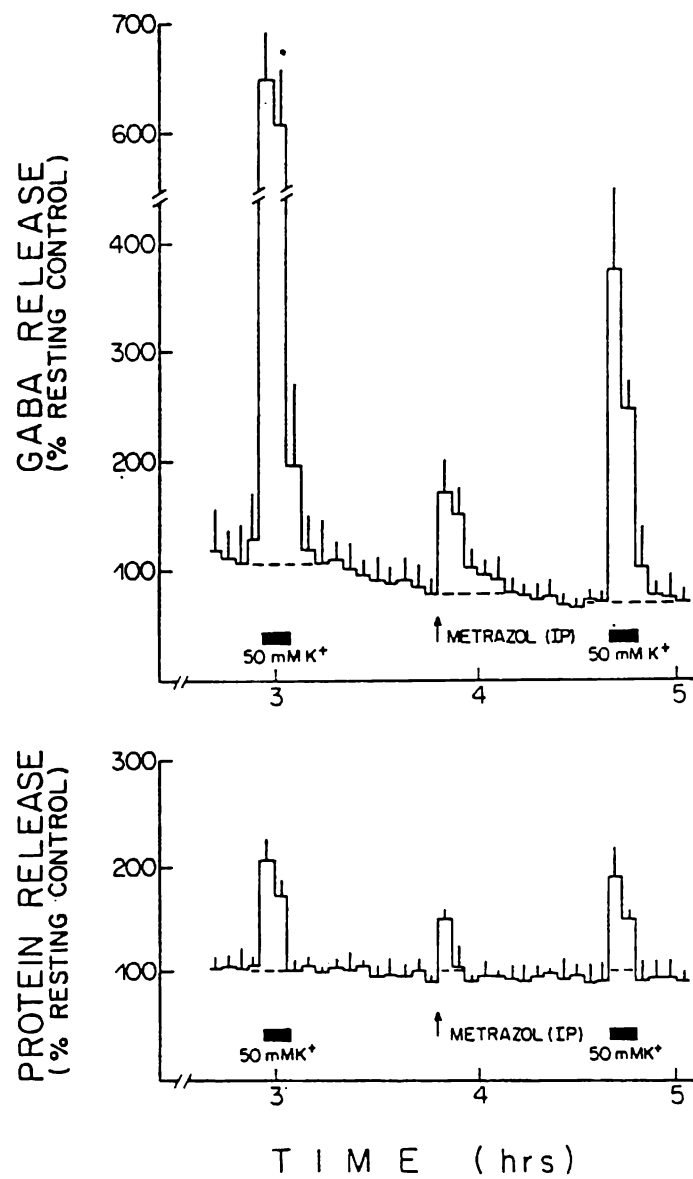


FIGURE 3. *In vivo* release of protein and GABA from rat brain after local or systemic stimulation. Perfusion was as described in FIGURE 2 except that the tissue was previously loaded with [<sup>3</sup>H]GABA. Release was evoked by local perfusion with 50 mM K<sup>+</sup> (8 min) and by intraperitoneal metrazol (40 mg/Kg). Release is expressed as % of the resting controls (mean  $\pm$  interval,  $N = 2$ ).

enkephalin is observed after repeated stimulation (FIGURE 5, lower panel), during perfusion sessions similar to those shown for GABA. This stability of the enkephalin-releasing systems during an *in vivo* perfusion session is particularly significant considering that earlier studies showed that enkephalin tissue stores in the pallidum are particularly labile to tissue damage—slicing of pallidal tissue decreases its enkephalin content by 30%.<sup>9</sup> Also, enkephalin release *in vivo* is markedly reduced by the gliosis produced in animals that have been previously perfused in this region.<sup>9,10</sup> In our experiments, the release of enkephalin and GABA in response to chemical stimulation was always blocked after severe mechanical damage to the tissue; partial recovery was seldom observed. Thus, changes in the release of endogenous enkephalin during perfusion appear to be a suitable indicator of changes in the functionality and re-

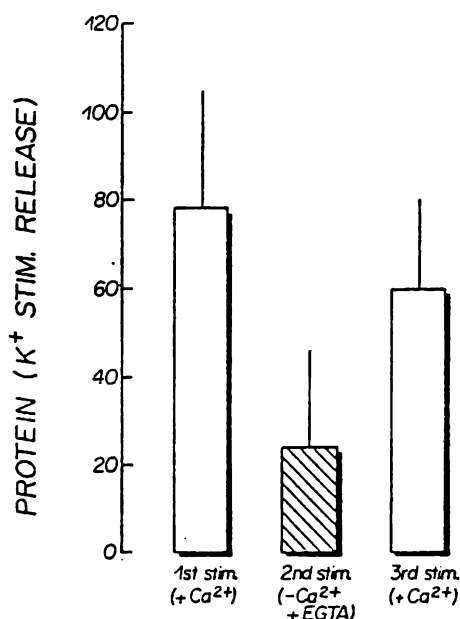


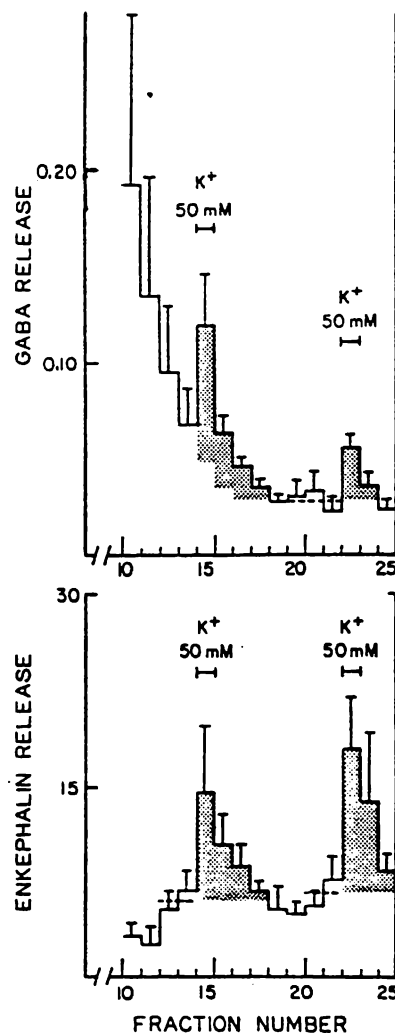
FIGURE 4. Dependence of the protein release on external calcium. Rats were perfused in the caudate-putamen following the protocol indicated in FIGURE 2. Release was stimulated by local perfusion with 50 mM K<sup>+</sup> (8 min). During the first and the third stimulations Ca<sup>2+</sup> was present in the perfusion medium; during the second stimulation Ca<sup>2+</sup> was omitted and EGTA 50 μM was present in the medium. K<sup>+</sup>-stimulated release is expressed as % of the resting control (mean ± SEM, N = 3).

sponsiveness of the region. Exogenous GABA can be used as a secondary marker of viability and as a control for the sampling efficiency of a probe.

#### *Comparison of the Performance of the Gaddum and the Slot Cannulae During in Vivo Perfusion*

In order to evaluate the advantages or disadvantages of the modification of the tip of the push-pull cannula (described in METHODS) compared to the traditional





**FIGURE 5.** Resting and stimulated release of [ $^3\text{H}$ ]GABA and endogenous enkephalin during *in vivo* push-pull perfusion of the globus pallidus of the rat. Upper panel: After insertion of the cannula, perfusions were started using the standard perfusing medium (Flow rate  $25 \mu\text{l}/\text{min}$ , fractions collected at 15-min intervals). For studying the release of exogenous GABA, [ $^3\text{H}$ ]GABA was added to the perfusing medium and circulated through the tissue within the first 30 min of the experiment. Release is given in % of this uptake. The initial exponential washout phase is followed by a steady resting-release process (horizontal dashed line; see Kondo & Iwatsuro<sup>29</sup> for the calculation of this baseline). [ $^3\text{H}$ ]GABA release (shaded areas) was stimulated depolarizing the tissue with perfusing medium containing  $50 \text{ mM K}^+$ . Lower panel: For studying the release of endogenous enkephalin the fractions were processed, as described in METHODS, for a Leu-enkephalin RIA, the results being expressed in enkephalin units (see METHODS). Since the resting release of endogenous enkephalin varies during perfusion, in order to determine the enkephalin release stimulated by  $50 \text{ mM K}^+$  (shaded areas), prestimulation values were defined as the average enkephalin content of the two collections preceding the stimulation (dashed lines). Values in this figure are the average  $\pm$  SEM of fractions collected in six perfusion sessions performed from 4:30 p.m. to 10:30 p.m.

design, we first analyzed the frequency of flow obstructions and vascular accidents observed during perfusions using these probes. TABLE 2 shows that with use of the modified slot model the bleeding episodes are reduced to those that occasionally, but almost unavoidably, occur after the acute insertion of the cannulae; flow obstructions are also seen less frequently when using the slot cannula. Surges of LDH and protein were always associated with insertions and flow obstructions.

However, no significant differences were seen in the basal levels of protein in perfusates obtained using either one of these probes, indicating that the sampling efficiency of the slot-cannula is comparable to that of the traditional model. In addition, the efficiency of both probes to deliver solutes into the perfused tissue was shown to be similar, since GABA uptake was about 30% using either cannula. The very low basal LDH activities in perfusates obtained with the Gaddum cannula are not significantly different from those obtained using the slot design. Also, the stimulated release and the resting release of GABA and enkephalin were similar with the Gaddum and the slot cannulae after 5 hr of perfusion. Thus, in spite of the marked differences in the frequency of accidental lesions observed using these two probes, they perform equally well at preserving the tissue viability. In summary, the slot cannula reduces the incidence of vascular accidents and flow occlusions occurring during perfusion, increasing the number of successful sessions when compared to the traditional design. These improvements allowed us to carry out long perfusion sessions needed for the studies of biological rhythms, which we present below.

*Release of Enkephalin during in Vivo Perfusion of the Globus Pallidus:  
Relationship to GABA Releasing Systems and Diurnal Rhythms*

The search for a model system to study the neurobiology of the enkephalins in the central nervous system<sup>30</sup> has led researchers to the striatum, which has one of the highest enkephalin concentrations in the brain<sup>28,31</sup> and is also one of the few macroscopic regions of the brain where the chemically related endorphin systems are not present.<sup>32-34</sup> Additionally, within the striatum, enkephalin perikarya and fibers are segregated: the globus pallidus is rich in fibers and terminals, all cell bodies being found in the caudo-putamen nucleus.<sup>35,36</sup> These advantages are exploited only in part when studying the release of enkephalin from the pallidum *in vitro*;<sup>11</sup> the use of an *in vivo* preparation to study the characteristics of enkephalin release takes advantage of the high density and anatomical segregation of enkephalin-containing terminals in the pallidum, while the integrity of pallidal connections with other brain regions is preserved. Previous studies demonstrated that endogenous immunoreactive enkephalin is released *in vivo* from the globus pallidus; this release is calcium dependent and is enhanced during local or caudate nucleus stimulation (see also FIGURE 5, lower panel).<sup>9,10,37</sup>

In order to understand the physiological mechanisms regulating the *in vivo* release of enkephalin in this model system, we studied the effects of putative transmitters present in the pallidum on the release of enkephalins. Since the globus pallidus is one of the brain region's richest in glutamate decarboxylase,<sup>27,39</sup> we investigated the relationship between the GABA-containing system and the release of enkephalin in this area.<sup>38</sup> These experiments revealed an enkephalin-releasing effect of the GABA receptor antagonist picrotoxin added *in situ*, suggesting that an endogenous GABA-ergic input tonically inhibits the release of enkephalin from the pallidum. Results from other laboratories supported this conclusion<sup>40,41</sup> showing, however, that the enkephalin-GABA interactions in the striatum were more complex than this.

In the course of these investigations on the regulation of the *in vivo* release of enkephalin from the globus pallidus of the rat, we observed that this release was consistently higher in the late afternoon and evening than in the morning hours. Circadian rhythms and other periodic changes of the systems that produce or recognize endogenous opiates had already been documented.<sup>42-49</sup> Some of the early failures to observe circadian changes in opiate peptides were due to very restricted sampling schedules.<sup>30,31</sup> Since many of these opiate rhythms had already been linked to physiological, endocrinological, or behavioral changes, the search for oscillations of opioid-mediated communication in a well-defined neural system promised to shed some light

TABLE 2. Comparison of the Performance of the Gaddum and the Slot Cannulae

	Gaddum Cannula	Slot Cannula
Bleeding episodes during perfusion <sup>a</sup>	4 in 6 perfusions (50% after cannula insertion)	1 in 6 perfusions (after cannula insertion)
Flow obstructions requiring cannula withdrawal <sup>a</sup>	5 in 6 perfusions	1 in 6 perfusions
LDH activity in perfusates in resting conditions <sup>b</sup>	1.5 ± 0.7	1.1 ± 0.6
Protein content in perfusates in resting conditions <sup>b</sup>	30 ± 12	35 ± 15
Enkephalin release <sup>c</sup>		
resting	15 ± 2	18 ± 4
K <sup>+</sup> -stimulated	29 ± 8	23 ± 3
[ <sup>3</sup> H]GABA uptake <sup>d</sup>	28 ± 5	29 ± 6
[ <sup>3</sup> H]GABA release <sup>d</sup>		
resting	0.13 ± 0.04	0.16 ± 0.04
K <sup>+</sup> -stimulated	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02

<sup>a</sup>Results from a series of twelve 6-hr perfusion sessions carried out in the pallidum of the rat in order to compare the Gaddum and slot cannulae. All bleeding episodes and severe flow obstructions are accompanied by increases in protein and LDH content in the corresponding perfusate fractions.

<sup>b</sup>LDH values are expressed in units/ml and protein in µg/ml;  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $N = 6$  perfusion sessions). Perfusate fractions collected during or after perfusion accidents were excluded from this calculation.

<sup>c</sup>Enkephalin values are expressed in units;  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $N = 6$ ). Enkephalin released as a consequence of stimulation is compared to that released during a resting control period.

<sup>d</sup>Perfusion of  $3.5 \times 10^6$  cpm of tritiated GABA during 30 min was followed by a washout period until a stable release was reached. The GABA remaining in the tissue (uptake) is expressed as % of the [<sup>3</sup>H]GABA perfused. GABA release values are expressed as % of GABA in the tissue  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $N = 6$ ).

on their local functional role. Given the link previously established between the GABA and the enkephalin systems in the pallidum, we decided to study and compare possible diurnal variations in the *in vivo* release of these messengers in this region.<sup>32</sup> The experimental protocols for *in vivo* perfusion were as those used in FIGURE 5. Six perfusion sessions were carried out from 8:00 a.m. to 2:30 p.m. (daytime perfusions) and six from 4:00 p.m. to 10:30 p.m. (evening perfusions). Resting enkephalin release increased 100% between 2:00 p.m. and 10:00 p.m., while [<sup>3</sup>H]GABA resting release decreased by 60% (FIGURE 6). The diurnal differences observed during resting release were more marked after stimulation: between day and evening perfusions the K<sup>+</sup>-

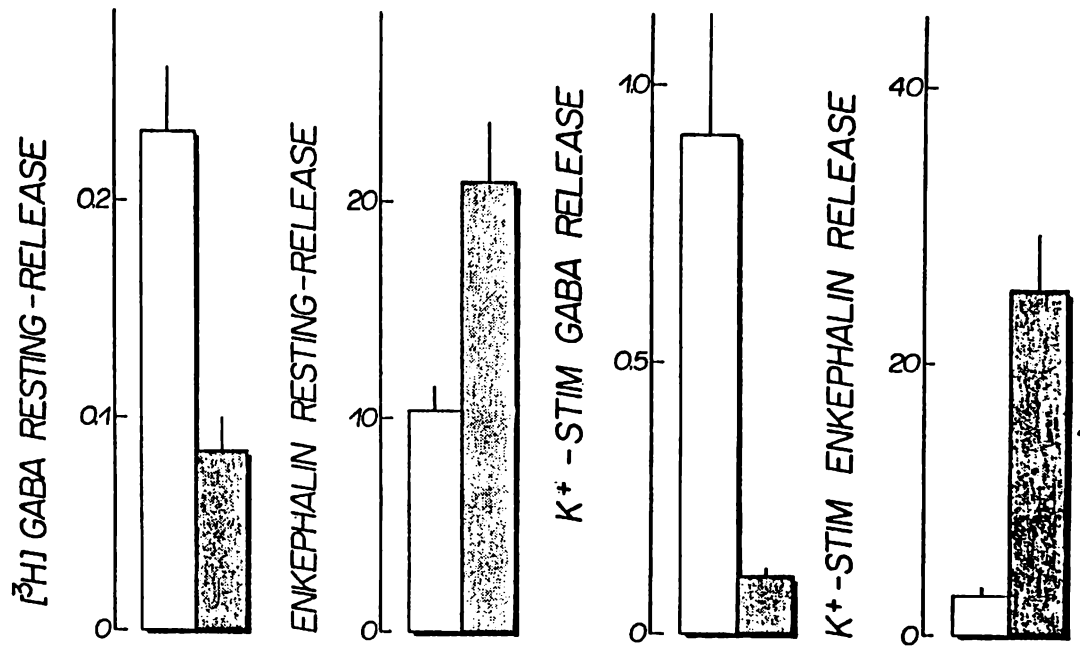


FIGURE 6. Release of endogenous enkephalin and [<sup>3</sup>H]GABA between daytime (□) and evening (■) hours. GABA resting-release decreased significantly ( $p < .05$ ) between 2:00 p.m. and 10:00 p.m. The enkephalin release between these hours showed an opposite, statistically significant difference ( $p < .05$ ). Resting GABA and enkephalin release are defined as indicated in FIGURE 5. Values are the average  $\pm$  SEM of six experiments. The K<sup>+</sup>-stimulated GABA release decreased 10-fold, while the enkephalin release increased sixfold between the morning and the evening hours. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $N = 8$ ).

stimulated enkephalin release increased sixfold while the  $K^+$ -stimulated [ $^3H$ ]GABA release decreased more than tenfold (FIGURE 6). Possible artifactual causes for these changes in transmitter release were considered and precautions were taken to follow the same experimental procedures during morning and evening sessions. The steady decrease in [ $^3H$ ]GABA release observed during the course of a perfusion session (FIGURE 5) was considered when analyzing the perfusion data. Therefore, comparison of resting and stimulated GABA release between morning and evening perfusions was made using perfusate fractions obtained with the same delay after the infusion of [ $^3H$ ]GABA. Also, it was found that the uptake of [ $^3H$ ]GABA and the fraction of radioactive tracer in the perfusates contributed by [ $^3H$ ]GABA were not different in the morning and evening sessions, and therefore do not account for the rhythm observed. Nevertheless, it must be noted that since the GABA we measured is exogenous, the anatomical structures and the mechanisms involved in its release may differ from those participating in the release of endogenous GABA.<sup>29,33,34</sup>

The diurnal rhythm observed in the release of enkephalin from the nerve terminals in the pallidum is not due to changes in the pallidal or caudate enkephalin content. Wesche and Frederickson<sup>49</sup> reported that in heat-stressed mice, but not in normal controls, the enkephalin levels, specifically in the globus pallidus, increased from 7:30 a.m. to 3:30 p.m. In our experiments the levels of enkephalin in the globus pallidus and in the caudate ( $5 \pm 1 \times 10^3$  units and  $2 \pm 0.2 \times 10^3$  units, respectively) were not significantly different at 8 a.m., 2 p.m., or 10 p.m.

The diurnal rhythms in the release of enkephalin and GABA follow opposite patterns, suggesting the possibility of reciprocal controlling mechanisms. We have previously referred to the evidence for the existence of an inhibitory GABAergic mechanism upon the release of enkephalin from the pallidum, but no evidence is available for an influence of opiates on the GABA systems in this region. However, the complexity of the multiple opiate-GABA interactions in the striatum has already been documented. Moroni *et al.*<sup>55,56</sup> have shown that an increased turnover of GABA is observed in the pallidum after the administration of opiates in the caudate. This effect appears to be due to an opiate-mediated inhibition of striatal GABAergic neurons, which in turn activate GABA neurons in the caudo-pallidal pathway. Clearly, the efforts to understand the mechanisms of the oscillation of GABA and enkephalin release in the pallidum have to go beyond the pallidal circuitry.

In relation to the functional role of these opposed diurnal rhythms of enkephalin and GABA release, it is noteworthy that their actions in the globus pallidus also have opposite effects on the motor activity of the rat: bilateral injection of enkephalin analogs in the pallidum leads to hyperactivity, an action blocked by naloxone.<sup>57</sup> In contrast, bilateral administration in the pallidum of drugs promoting GABAergic transmission produces akinesia and catalepsy, while the opposite is observed with drugs antagonizing this transmitter.<sup>58,59</sup> Thus, an increased enkephalin release and a reduced GABA release at night in the pallidum would lead to hyperactivity. Since the rat is a nocturnal animal we suggest that the enkephalin-GABA transmission in the pallidum may be an important link in the neural control of the diurnal rhythms of motor activity in the rat.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. W. J. Shoemaker and Mrs. R. Azad-Fryer from the A. V. Davis Center of the Salk Institute for the preliminary tests of our anti-

enkephalin sera. Synthetic enkephalins were a generous gift from Dr. N. Ling. The technical assistance of Mrs. M. Sordo is gratefully recognized.

## REFERENCES

1. GADDUM, J. H. 1961. *J. Physiol. (Lond.)* 155: 1-2.
2. MYERS, R. D. 1970. *Physiol. Behav.* 5: 243-246.
3. NEOUILLON, A., A. CHERAMY & J. GLOWINSKI. 1977. *J. Neurochem.* 28: 819-828.
4. IJIMA, T. & K. NUNOKI. 1985. *In In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances.* A. Bayón & R. Drucker-Colin, Eds. Ch.4. Academic Press. New York.
5. PHILIPPU, A. 1985. *In In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive substances.* A. Bayon & R. Drucker-Colin, Eds. Ch. 13. Academic Press. New York.
6. PHILIPPU, A., H. PRZUNTEK & W. ROENBERG. 1973. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 276: 103-118.
7. HAMBERGER, A., C-H. BERTHOLD, I. JACOBSON, B. KARLSSON, A. LEHMANN, B. NYSTROM & M. SANDBERG. 1985. *In In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances.* A. Bayón & R. Drucker-Colin, Eds. Ch. 8. Academic Press. New York.
8. KONIG, J. F. R. & R. A. KLIPPEL. 1967. *The Rat Brain.* Krieger. Huntington, NY.
9. BAYÓN, A., R. DRUCKER-COLÍN, L. LUGO, W. J. SHOEMAKER, R. AZAD & F. E. BLOOM. 1981. *In: Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission.* R. Tapia & W. Cotman, Eds.: 29-41. Plenum Press. New York.
10. BAYÓN, A., W. J. SHOEMAKER, L. LUGO, R. AZAD, N. LING, R. DRUCKER-COLÍN & F. E. BLOOM. 1981. *Neurosci. Lett.* 24: 65-70.
11. BAYÓN, A., J. ROSSIER, A. MAUSS, F. E. BLOOM, L. L. IVERSEN, N. LING & R. GUILLEMIN. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3503-3506.
12. LOWRY O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL. 1951. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
13. BRADFORD, M. M. 1976. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
14. BERGMAYER, H. U. 1974. *Methods of Enzymatic Analysis.* 2nd edit. 2: 574-579. Academic Press. New York.
15. ELLMAN, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES & R. M. FEATHERSTONE. 1961. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
16. RINDERKNECHT, H., M. C. GEOKAS, P. SILVERMAN & B. J. HAVERBACK. 1968. *Clinica Chim. Acta* 21: 197-203.
17. FRICKE, U. 1975. *Anal. Biochem.* 63: 555-558.
18. SANDOVAL, M. E., C. A. TORNER & L. MEDRANO. 1984. *Neuroscience* 11: 867.
19. ROSSIER, J., A. BAYÓN, T. M. VARGO, N. LING, R. GUILLEMIN & F. E. BLOOM. 1977. *Life Sci.* 21: 847-852.
20. HONCHAR, M. P., B. K. HARTMAN & L. G. SHARPE. 1979. *Am. J. Physiol.* 236: R 45-56.
21. YAKSH, T. L. & H. I. YAMAMURA. 1974. *J. Appl. Physiol.* 37: 428-434.
22. HOFSTEIN, R., G. HESSE & V. E. SHASHOUA. 1983. *J. Neurochem.* 40: 1448-1455.
23. DRUCKER-COLIN, R. 1981. *In Psychopharmacology of Sleep.* D. Wheatley, Ed.: 53-72. Raven Press. New York.
24. LAJTHA, A. H. 1983. *Handbook of Neurochemistry.* 2nd edit. Enzymes in the nervous system. Vol. 4. Plenum Press. New York.
25. GREENFIELD, S., A. CHERAMY, V. LEVIEL & J. GLOWINSKI. 1980. *Nature* 284: 355-357.
26. GREENFIELD, S., A. CHERAMY & J. GLOWINSKI. 1983. *J. Neurochem.* 40: 1048-1057.
27. GOTTESFELD, Z. & D. M. JACOBOWITZ. 1978. *In Interactions Between Putative Neurotransmitters in the Brain.* S. Garattini, J. Pujol & R. Samanin, Eds.: 109-126. Raven Press. New York.
28. YANG, H-Y., J. S. HONG & E. COSTA. 1977. *Neuropharmacol.* 16: 303-307.
29. KONDO, Y. & K. IWATSURO. 1978. *Brain Res.* 154: 395-400.
30. HUGHES, J., T. W. SMITH, H. W. KOSTERLITZ, L. H. FOTHERGILL, B. A. MORGAN & H. MORRIS. 1975. *Nature (Lond.)* 255: 577-579.

31. HÖKFELT, T., R. ELDE, O. JOHANSSON, L. TERENIUS & L. STEIN. 1977. *Neurosci. Lett.* 5: 25-31.
32. BAYÓN, A., W. J. SHOEMAKER, F. E. BLOOM, A. MAUSS & R. GUILLEMIN. 1979. *Brain Res.* 179: 93-101.
33. BAYÓN, A., L. KODA, E. BATTENBERG, R. AZAD, R. GUILLEMIN & F. E. BLOOM. 1980. *Neurosci. Lett.* 16: 75-80.
34. BLOOM, F., E. BATTENBERG, J. ROSSIER, N. LING & R. GUILLEMIN. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1591-1595.
35. BAYÓN, A., L. KODA, E. BATTENBERG & F. E. BLOOM. 1980. *Brain Res.* 183: 103-111.
36. CUELLO, A. C. & S. G. PAXINOS. 1978. *Nature (Lond.)* 271: 178-180.
37. CESSÉLIN, F., P. SOUBRIE, S. BOURGOIN, F. ARTAUD, T. D. REISINE, R. MICHELOT, J. GLOWINSKI & M. HAMON. 1981. *Neuroscience* 6: 301-313.
38. RIBAK, C. E. 1981. *In* GABA and the Basal Ganglia. G. DiChiara & G. L. Gessa, Eds.: 23-36. Raven Press. New York.
39. BAYÓN, A., R. DRUCKER-COLIN, L. LUGO, W. J. SHOEMAKER, R. AZAD & F. E. BLOOM. 1981. *Soc. Neurosci. Abstr.* 7: 800.
40. HERZ, A., T. DUKA, C. GRAMSCH, V. HÖLLT, H. OSBORNE, R. PRZEWLOCKI, R. SCHULTZ & M. WÜSTER. 1980. *In* Neural Peptides and Neuronal Communication. E. Costa & M. Trabucchi, Eds.: 323-333. Raven Press. New York.
41. BOURGOIN, S., F. CESSÉLIN, F. ARTAUD, J. GLOWINSKI & M. HAMON. 1982. *Brain Res.* 248: 321-330.
42. CAMPOS, A. E., M. LUJÁN, E. LÓPEZ, J. L. FIGUEROA-HERNÁNDEZ & R. RODRÍGUEZ. 1983. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 26: 101-103.
43. FREDERICKSON, R. C. A., V. BURGIS & J. EDWARDS. 1977. *Science* 198: 756-758.
44. KUMAR, M. S. A., C. L. CHEN & T. F. MÜTHER. 1979. *Life Sci.* 25: 1687-1696.
45. KUMAR, M. S. A., C. L. CHEN, D. C. SHARP, J. M. LIU, P. S. KALRA & S. R. KALRA. 1982. *Neuroendocrinology* 35: 28-31.
46. NABER, D., R. M. COHEN, D. X. PICKER, W. H. KLINE, G. DAVIS, C. B. PERT & W. E. BUNNEY JR. 1981. *Life Sci.* 28: 931-935.
47. PRZEWLOCKI, R., W. LASON, A. M. KONECKA, C. GRAMSCH, A. HERZ & L. D. REID. 1983. *Science* 219: 71-73.
48. VON KNORRING, L., B. G. L. ALMAY, F. JOHANSSON, L. TERENIUS & A. WAHLSTROM. 1982. *Pain* 12: 265-272.
49. WESCHE, D. L. & R. C. A. FREDERICKSON. 1981. *In* Advances in Endogenous and Exogenous Opioids. (Proc. Int. Narcotic Res. Conf.) Kodansha Ltd. Tokyo. pp. 232-234.
50. CHILDERS, S. R. & S. H. SNYDER. 1979. *In* Endorphins in Mental Health Research. E. Usdin, W. E. Bunney & N. S. Kline, Eds.: 181-188. MacMillan Press. London.
51. WESCHE, D. L. & R. C. A. FREDERICKSON. 1979. *Life Sci.* 24: 1861-1868.
52. BAYÓN, A., B. ANTÓN & D. DÍAZ-PONTONES. 1983. *Soc. Neurosci. Abstr.* 9: 588.
53. KEMEL, M. L., C. GAUCHI, J. GLOWINSKI & M. J. BESSON. 1979. *Life Sci.* 24: 2139-2150.
54. VAN DER HEYDEN, J. A. M., K. VENEMA & J. KORF. 1980. *J. Neurochem.* 34: 1648-1653.
55. MORONI, F., D. L. CHENEY, E. PERALTA & E. COSTA. 1978. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207: 870-877.
56. MORONI, F., E. PERALTA, D. L. CHENEY & E. COSTA. 1979. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208: 190-194.
57. JOYCE, E. M., G. F. KOOB, R. STRECKER, S. D. IVERSEN & F. E. BLOOM. 1981. *Brain Res.* 221: 359-370.
58. PYCOCK, C., R. W. HORTON & C. D. MARSDEN. 1976. *Brain Res.* 116: 353-359.
59. SCHEEL-KRÜGER, J., G. MAGELUND & M. C. OLIANAS. 1981. *In* GABA and the Basal Ganglia. G. DiChiara & G. L. Gessa, Eds.: 165-186. Raven Press. New York.

PUBLICACION

III



RPT 00494

## Diurnal rhythm of the in vivo release of enkephalin from the globus pallidus of the rat

Alejandro Bayón\* and Benito Antón

*Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-228, 04510 México D.F., and Unidad de Neuroquímica Analítica, Instituto Mexicano de Psiquiatría, S.S.C. México-Xochimilco 101, 14370 Mexico D.F., Mexico*

(Received 23 January 1986; revised manuscript received 29 April 1986; accepted for publication 1 May 1986)

---

### Summary

The in vivo spontaneous release of enkephalin in the globus pallidus of the rat increases from noon to evening by 100%; during this period the local release of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) decreases by 60%. These diurnal rhythms are more marked in the  $K^+$ -stimulated release: enkephalin-induced output increases 6-fold while GABA decreases 10-fold during the afternoon and evening hours. Since pallidal enkephalin and GABA are involved in the control of locomotor activity we suggest that these rhythms may be linked to the circadian changes of activity in the rat.

enkephalin; GABA; biological rhythms; globus pallidus; rat

---

### Introduction

The study of the neurobiology of enkephalins in the CNS [1] has found a suitable model system in the striatum, which has one of the higher concentrations of these opioids in brain [2,3]. Within the striatum enkephalin containing perikarya and fibers are segregated: cell bodies are found in the caudo-putamen nucleus and the globus pallidus is rich in fibers and terminals [4,5]. This disposition has facilitated the study of the mechanism and regulation of enkephalin release from central neurons and

---

\* To whom all correspondence should be addressed. Phone (905) 548-81-79.

terminals both in vitro and in vivo [6–11]. The use of an in vivo preparation – push-pull cannula perfusion [12] – takes advantage of the high density and anatomical segregation of enkephalin-containing terminals in the pallidum, while preserving the integrity of its connections with other brain regions.

In order to advance in our understanding of the physiological mechanisms regulating the in vivo release of enkephalin in this model system, we have been studying effects of putative transmitters present in the pallidum on the release of enkephalins. Since the globus pallidus is one of the brain regions richest in glutamate decarboxylase [13] we initially investigated the relationship between the GABA containing system and the release of enkephalin in this area [14]; these experiments revealed an enkephalin-releasing effect of the GABA receptor antagonist picrotoxin injected in situ, suggesting that an endogenous GABA-ergic input tonically inhibits the release of enkephalin from the pallidum. Results from other laboratories supported this conclusion [15,16], showing, however, that the enkephalin-GABA interactions in the striatum were more complex than this. Therefore, we decided to make this parallel study of the release of enkephalin and GABA from the pallidum of freely moving rats along extended periods of time [17].

## Methods

Male albino rats, local Wistar strain, weighing 150–200 g were anesthetized with sodium pentobarbital. Surgery, under aseptic conditions, was limited to the stereotaxic implantation of a stainless-steel 18-gauge guide cannula which was chronically fixed to the skull with acrylic cement. The lumen of the guide was temporarily blocked with a tight-fitting rod until the day of perfusion, one week after surgery; each rat was subjected to a single session. Two hours before the beginning of the perfusion the implanted animals were placed in transparent plastic cages (their usual housing) in a quiet, isolated room. The animals remained free to move during perfusion. The protective mandrel was removed from the guide, and the perfusing cannula [18] was slowly inserted and clamped in place. Coordinates for the globus pallidus (A 6.4, L 2.5, H 0.2) were taken from the atlas of König and Klippel [19]. At the end of the perfusion, the position of the tip of the cannula was verified by inspection of frontal sections of the brain under microscope. From the onset of perfusion the flow rate was held constant (25  $\mu$ l/min), effluent fractions being collected at 15-min intervals. The standard perfusion medium was a Krebs–Ringer bicarbonate buffer: 127 mM NaCl, 3.73 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, D-glucose 2 g/l. Bovine serum albumin (BSA, 0.1%), and bacitracin (30  $\mu$ g/ml) were included in the medium as protective agents for enkephalin release studies [8]. Chemical stimulation of the perfused tissue was produced by substituting K<sup>+</sup> for Na<sup>+</sup> in the standard medium to reach a 50 mM K<sup>+</sup> concentration.

In order to study the release of enkephalin into the effluent medium, fractions were collected in plastic tubes containing 0.5 ml of 2 N ice-cold acetic acid in order to stop enzymatic degradation; these fractions were then boiled for 15 min, lyophilized, and resuspended in phosphate-buffered saline for the enkephalin radioimmunoassay

(RIA). We have described this assay elsewhere [18]. Antisera were raised in rabbits against a BSA-Leu-enkephalin conjugate and were used in the assay in a 1:1500 final dilution, giving a sensitivity of 2–5 pg of Leu-enkephalin using  $^{125}\text{I}$ -labeled tracer. Met-enkephalin cross-reacts 0.3% and enkephalin fragments, endorphins and dynorphin cross-react less than 0.01%. Since the assay reads both enkephalins, an enkephalin unit has been defined as the amount of immunoreactive material producing a tracer displacement equal to that observed with 1 pg of synthetic Leu-enkephalin [20].

To study the release of GABA, tritiated  $\gamma$ -aminobutyric acid ( $^3\text{H}$ GABA, specific activity 34 Ci/mmol, Amersham) was added to the standard perfusion medium at the beginning of the perfusion ( $4\text{--}20 \times 10^6$  cpm in 750  $\mu\text{l}$ , perfused in 30 min). The  $^3\text{H}$ GABA not retained by the tissue was washed out during the 1–2 h that followed. During this process and throughout the rest of the perfusion, 10- $\mu\text{l}$  aliquots from each collected fraction were counted in trititol [21] to determine the resting and the evoked release of  $^3\text{H}$ GABA. The fraction of the tritiated material in the perfusates that was contributed by  $^3\text{H}$ GABA was determined by analysis of the samples in ion-exchange chromatography, followed by TLC [22]. In spite of the fact that no inhibitor of GABA metabolism was added to the perfusing media, 60% of the tracer released during the third hour of perfusion was GABA. This proportion was reduced to 30% after the 6th hour. When release was evoked by depolarization, the fraction of counts coeluting with GABA was more than 50% higher than that found in perfusates obtained during resting conditions. Since these ratios remained constant in the different experimental conditions presented in this work, release data are calculated from uncorrected total counts per minute in the perfusate fractions.

## Results

The resting and the stimulated release of enkephalin and  $^3\text{H}$ GABA were studied in parallel during long perfusion sessions (more than 6 h) as shown in Fig. 1. Experiments like these, performed during the morning and in the afternoon, showed a consistent increase in the resting release of enkephalin towards the evening hours (see lower panel of the figure). A systematical analysis of the resting enkephalin release values during the day is presented in Fig. 2, showing that enkephalin release steadily and significantly increases during the second half of the day. These results led us to compare the resting release of enkephalin and  $^3\text{H}$ GABA between daytime (1:30–2:30 p.m.) and evening hours (9:30–10:30 p.m.). Six perfusion sessions were carried out from 8:00 a.m. to 2:30 p.m. (daytime perfusions) and six from 4:00 p.m. to 10:30 p.m. (evening perfusions). The resting enkephalin release increased 100% between 2:00 p.m. and 10:00 p.m., while  $^3\text{H}$ GABA resting release decreased by 60% during this period (Table I). In contrast with these changes, the enkephalin levels in the globus pallidus and in the caudate ( $5 \pm 1 \times 10^3$  units and  $2 \pm 0.2 \times 10^3$  units, respectively) were not significantly different at 8:00 a.m., 2:00 p.m., and 10:00 p.m.; also, the uptake of  $^3\text{H}$ GABA was similar in morning and evening perfusion sessions ( $55 \pm 5\%$  and  $61 \pm 4\%$  of the total radioactivity infused, respectively). The diurnal

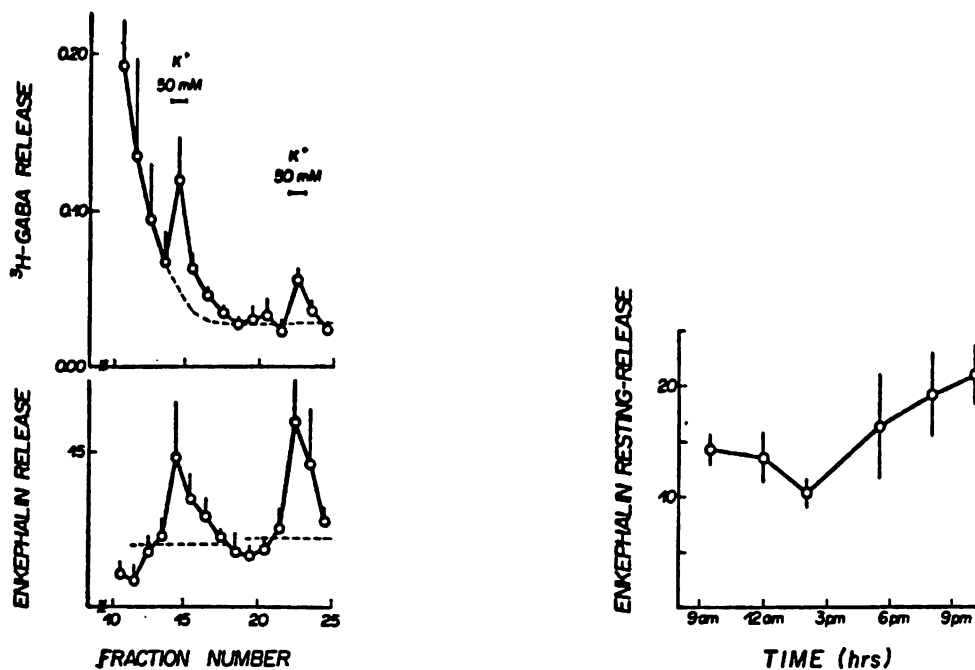


Fig. 1. Resting and stimulated release of [ $^3\text{H}$ ]GABA and endogenous enkephalin during *in vivo* push-pull perfusion of the globus pallidus of the rat. *Upper panel:* After insertion of the cannula, perfusions were started using the standard perfusing medium (flow rate 25  $\mu\text{l}/\text{min}$ , fractions collected at 15 min intervals). For studying the release of exogenous GABA, [ $^3\text{H}$ ]GABA was added to the perfusing medium and circulated through the tissue within the first 30 min of the experiment. The initial exponential washout phase is followed by a steady resting-release process (dashed line; see Ref. 39 for the estimation of this baseline). Release values are given as % of the [ $^3\text{H}$ ]GABA retained in the tissue at the end of the perfusion. [ $^3\text{H}$ ]GABA release (peak areas) was stimulated by depolarizing the tissue with perfusing medium containing 50 mM  $\text{K}^+$ . *Lower panel:* For studying the release of endogenous enkephalin the fractions were processed as described in Methods for a Leu-enkephalin RIA, the results being expressed in enkephalin units. Since the resting release of endogenous enkephalin varies during perfusion (see Discussion), in order to determine the enkephalin release stimulated by 50 mM  $\text{K}^+$  (peak areas) prestimulation values were defined as the average enkephalin content of the two collections preceding the stimulation (dashed lines). Values in this figure are the average  $\pm$  S.E.M. of fractions collected in 6 perfusion sessions performed from 4:30 p.m. to 10:30 p.m.

Fig. 2. *In vivo* resting enkephalin release from the rat globus pallidus during the course of daytime and evening perfusion sessions. Six perfusion sessions were carried out from 8:00 a.m. to 2:30 p.m. (daytime) and 6 from 4:00 p.m. to 10:30 p.m. (evening). In each perfusion the average resting release of enkephalin was determined at times close to the beginning, the middle, and the end of the session. Each value is the mean ( $\pm$  S.E.M.) of the enkephalin contents in perfusate fractions collected during 1 h. The resting enkephalin release values observed at the end of the daytime perfusions and at the end of the evening perfusions were significantly different ( $P < 0.05$ ).

differences observed in the release of enkephalin and [ $^3\text{H}$ ]GABA were more marked with depolarizing stimulation:  $\text{K}^+$ -stimulated enkephalin release increased about 6-fold between daytime and evening perfusions, while the  $\text{K}^+$ -stimulated [ $^3\text{H}$ ]GABA release decreased more than 10-fold (Fig. 3).

TABLE I

Resting release of GABA and enkephalin from the pallidum

	Daytime (1:30–2:30 p.m.)	Evening (9:30–10:30 p.m.)
Enkephalin resting release	10.2 ± 1.0	20.7 ± 2.6
[ <sup>3</sup> H]GABA resting release	0.23 ± 0.03	0.084 ± 0.016

Increase in enkephalin release and decrease in [<sup>3</sup>H]GABA release between daytime and evening hours are statistically significant with  $P < 0.05$ . Resting enkephalin and [<sup>3</sup>H]GABA release values were calculated as indicated in Fig. 2 (Enk. units/h and % [<sup>3</sup>H]GABA released/h). Values are the average ± S.E.M. of 6 experiments.

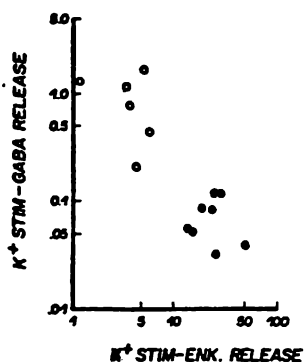


Fig. 3.  $K^+$ -stimulated release of exogenous GABA and endogenous enkephalin from the globus pallidus in daytime and evening perfusion sessions. Release values are plotted in log-enkephalin vs. log-GABA scales: O, independent data obtained from morning perfusions; ●, evening perfusions.  $K^+$ -stimulated GABA release decreased from  $0.90 \pm 0.19$  to  $0.08 \pm 0.04\%$  and enkephalin release increased from  $4.4 \pm 1.3$  to  $25.0 \pm 3.8$  units between morning and evening hours. Values are expressed as the mean ± S.E.M.

## Discussion

Circadian rhythms and other periodic changes of the systems that produce or recognize endogenous opiates have already been documented [23–30]; some of the early failures to observe circadian changes in opiate peptides were due to very restricted sampling schedules [31,32]. However, since there are other possible causes for the changes we observed in transmitter release, precautions were taken to follow the same experimental procedures for morning and evening perfusions (i.e. experimenters, rat litters, implantation and perfusion procedures, environmental conditions, analytical procedures). Special attention was given to the fact that Cesselin et al. [11] reported that the enkephalin content and release in the globus pallidus of the

rat was higher in the anterior portion than in the caudal part of this structure: in our experiments there was no correlation between the localization of the cannula tracks and the measured release of enkephalins or GABA. Possible changes in the tissue stores of transmitters were also considered: the stability and viability of our preparation during perfusion has already been demonstrated [18], the decrease in [ $^3\text{H}$ ]GABA release during perfusion being due to the reduction of the labeled releasable pool (because of this limitation, we restricted our comparisons of resting and stimulated GABA release between morning and evening perfusions to the data obtained from perfusate fractions collected with the same delay after the infusion of [ $^3\text{H}$ ]GABA). The uptake of [ $^3\text{H}$ ]GABA and the fraction of radioactive tracer in the perfusates contributed by [ $^3\text{H}$ ]GABA were not different in the morning and evening sessions, and therefore do not account for the rhythm observed. Also, the diurnal rhythm observed in the release of enkephalin from the nerve terminals in the pallidum is not due to changes in the pallidal or caudate enkephalin content. Wesche and Frederickson [30] reported that in heat-stressed mice, but not in normal controls, the enkephalin levels, specifically in the globus pallidus, increased from 7:30 a.m. to 3:30 p.m. In our experiments the levels of enkephalin in the globus pallidus and in the caudate were not significantly different at different times of the day and evening.

The diurnal rhythms in the release of enkephalin and GABA follow opposite patterns, suggesting the possibility of reciprocal controlling mechanisms. We have previously referred to the evidence for the existence of an inhibitory GABAergic mechanism upon the release of enkephalin from the pallidum, but no evidence is available of an influence of opiates on the GABA systems in this region. However the complexity of the multiple opiate-GABA interactions in the striatum has already been documented. Moroni et al. [33,34] have shown that an increased turnover of GABA is observed in the pallidum after the administration of opiates in the caudate. This effect appears to be due to an opiate-mediated inhibition of striatal GABAergic neurons, which in turn activate GABA neurons in the caudopallidal pathway. Clearly, the efforts to understand the mechanisms of the oscillation of GABA and enkephalin release in the pallidum have to go beyond the pallidal circuitry.

Opiate-GABA interactions observed at the behavioral level appear relevant to the interpretation of our observations. Systemic administration of drugs promoting GABAergic transmission reduces locomotor activity in the rat, this effect being potentiated by the opiate antagonist naloxone; also, the locomotion reducing effects produced by naloxone alone are blocked by GABA receptor antagonists [35]. The effects of enkephalin and GABA in the globus pallidus have been documented, showing that these transmitters have opposite effects on the motor activity of the rat consistent with those observed after their systemic administration: bilateral injection of enkephalin analogs in the pallidum leads to hyperactivity, an action which is blocked by naloxone [36]. In contrast, bilateral administration in the pallidum of drugs promoting GABAergic transmission produces akinesia and catalepsy, while the opposite is observed with drugs antagonizing this transmitter [37,38]. Thus, an increased enkephalin release and a reduced GABA release at night hours in the pallidum, shown in this paper, could lead to hyperactivity. Since the rat is a nightly-active animal, we suggest that the enkephalin-GABA transmission in the pallidum may be an important link in the neural control of the diurnal rhythms of motor activity in the rat.

## Acknowledgements

The assistance of Mrs. M. Sordo is gratefully recognized. This work was supported in part by grants from CONACYT, Mexico and Fondo de Estudios e Investigaciones, R.J. Zevada.

## References

- 1 Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.H., Morgan, B.A. and Morris, H., Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity, *Nature*, 255 (1975) 577-579.
- 2 Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Terenius, L. and Stein, L., The distribution of enkephalin immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system, *Neurosci. Lett.*, 5 (1977) 25-31.
- 3 Yang, H.-Y., Hong, J.S. and Costa, E., Regional distribution of Leu- and Met-enkephalin in the brain, *Neuropharmacology*, 16 (1977) 303-307.
- 4 Cuello, A.C. and Paxinos, S.G., Evidence for a long Leu<sup>3</sup>-enkephalin strio-pallidal pathway in rat brain, *Nature*, 271 (1978) 178-180.
- 5 Bayón, A., Koda, L., Battenberg, E. and Bloom, F.E., Redistribution of endorphin and enkephalin immunoreactivity in the rat brain and pituitary after in vivo treatment with colchicine or cytochalasin B, *Brain Res.*, 183 (1980) 103-111.
- 6 Henderson, G., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W., In vitro release of Leu- and Met-enkephalin from the corpus striatum, *Nature*, 271 (1978) 677-679.
- 7 Iversen, L.L., Iversen, S.D., Bloom, F.E., Vargo, T. and Guillemin, R., Release of enkephalin from rat globus pallidus in vitro, *Nature*, 271 (1978) 679-681.
- 8 Bayón, A., Rossier, J., Mauss, A., Bloom, F.E., Iversen, L.L., Ling, N. and Guillemin, R., In vitro release of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin from the rat globus pallidus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75 (1978) 3503-3506.
- 9 Bayón, A., Drucker-Colin, R., Lugo, L., Shoemaker, W.J., Azad, R. and Bloom, F.E., Enkephalin release from the globus pallidus: in vitro and in vivo studies. In: R. Tapia and W. Cotman (eds.), *Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission*, Plenum Press, New York, 1981, pp. 29-41.
- 10 Bayón, A., Shoemaker, W.J., Lugo, L., Azad, R., Ling, N., Drucker-Colin, R. and Bloom, F.E., In vivo release of enkephalin from the globus pallidus, *Neurosci. Lett.*, 24 (1981) 65-70.
- 11 Cesselin, F., Soubrie, P., Bourgoin, S., Artaud, F., Reisine, T.D., Michelot, R., Glowinski, J. and Hamon, M., In vivo release of Met-enkephalin in the cat brain, *Neuroscience*, 6 (1981) 301-313.
- 12 Myers, R.D., An improved push-pull cannula system for perfusing an isolated region of the brain, *Physiol. Behav.*, 5 (1970) 243-246.
- 13 Riback, C.E., The GABAergic neurons of the extrapyramidal system as revealed by immunocytochemistry. In: G. DiChiara and G.L. Gessa (eds.), *GABA and the Basal Ganglia*, Raven Press, New York, 1981, pp. 23-36.
- 14 Bayón, A., Drucker-Colin, R., Lugo, L., Shoemaker, W.J., Azad, R. and Bloom, F.E., In vivo release of enkephalin from the globus pallidus is tonically inhibited by endogenous GABA, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 7 (1981) 800.
- 15 Herz, A., Duka, T., Gramsch, C., Höllt, V., Osborne, H., Przewlocki, R., Schultz, R. and Wüster, M., Pharmacologic manipulation of brain and pituitary endorphin content and release. In E. Costa and M. Trabucchi (eds.), *Neural Peptides and Neuronal Communication*, Raven Press, New York, 1980, pp. 323-333.
- 16 Bourgoin, S., Cesselin, F., Artaud, F., Glowinski, J. and Hamon, M., In vivo modulation by GABA-related drugs of Met-enkephalin release in basal ganglia of the cat brain, *Brain Res.*, 248 (1982) 321-330.
- 17 Bayón, A., Antón, B. and Diaz-Pontones, D., In vivo enkephalin release from the globus pallidus of the rat; diurnal rhythm and relationship with GABA-releasing systems, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 9 (1983) 588.

- 18 Bayón, A., Solano, S., Antón, B., Castaño, I. and Diaz, D., Push-pull perfusion studies on the in vivo release of proteins, enzymes and the neuroactive peptides-enkephalins from the rat brain. In: A. Bayón and R. Drucker-Colin (eds.), *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances*, Academic Press, Orlando, Florida, 1985, pp. 69-93.
- 19 König, J.F.R. and Klippel, R.A., *The Rat Brain*, Krieger, New York, 1967, 162 pp.
- 20 Rossier, J., Bayón, A., Vargo, T.M., Ling, N., Guillemin, R. and Bloom, F.E., Radioimmunoassay of brain peptides: evaluation of a methodology for the assay of  $\beta$ -endorphin and enkephalin, *Life Sci.*, 21 (1977) 847-852.
- 21 Fricke, U., Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton-X-100, *Anal. Biochem.*, 63 (1975) 555-558.
- 22 Sandoval, M.E., Torner, C.A. and Medrano, L., High affinity uptake and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent release of glutamic acid in the developing cerebellum, *Neuroscience*, 11 (1984) 867-875.
- 23 Campos, A.E., Luján, M., López, E., Figueroa-Hernández, J.L. and Rodríguez, R., Circadian variation in the lethal effect of morphine in the mouse, *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 26 (1983) 101-103.
- 24 Frederickson, R.C.A., Burgis, V. and Edwards, J., Hyperalgesia induced by naloxone follows diurnal rhythm in responsivity to painful stimuli, *Science*, 198 (1977) 756-758.
- 25 Kumar, M.S.A., Chen, C.L. and Muther, T.F., Changes in pituitary and hypothalamic content of met-enkephalin during the estrous cycle of rats, *Life Sci.*, 25 (1979) 1687-1696.
- 26 Kumar, M.S.A., Chen, C.L., Sharp, D.C., Liu, J.M., Kaira, P.S. and Kaira, S.R., Diurnal fluctuation in methionine-enkephalin levels in the hypothalamus and preoptic area of the male rat: effects of pinealectomy, *Neuroendocrinology*, 35 (1982) 28-31.
- 27 Naber, D., Cohen, R.M., Picker, D., Kline, W.H., Davis, G., Pert, C.B. and Bunney, W.E., Jr., Episodic secretion of opioid activity in human plasma and monkey CSF: evidence for a diurnal rhythm, *Life Sci.*, 28 (1981) 931-935.
- 28 Przewlocki, R., Lason, W., Konecka, A.M., Gramsch, C., Herz, A. and Reid, L.D., The opioid peptide dynorphin: circadian rhythms and starvation, *Science*, 219 (1983) 71-73.
- 29 von Knorring, L., Almay, B.G.L., Johansson, F., Terenius, L. and Wahlstrom, A., Circannual variation in concentrations of endorphins in cerebrospinal fluid, *Pain*, 12 (1982) 265-272.
- 30 Wesche, D.L. and Frederickson, R.C.A., Diurnal rhythm in response to noxious stimuli—increase of Met-enkephalin in globus pallidus. In: *Advances in Endogenous and Exogenous Opioids* (Proc. Int. Narcotic Res. Conf.), Kodansha, Tokyo, 1981, pp. 232-234.
- 31 Chatters, S.R. and Snyder, S.H., Diurnal variation, post-mortem degradation and effect of cycloheximide. In: E. Usdin, W.E. Bunney and N.S. Kline (eds.), *Endorphins in Mental Health Research*, MacMillan, London, 1979, pp. 181-188.
- 32 Wesche, D.L. and Frederickson, R.C.A., Diurnal differences in opioid peptide levels correlated with nociceptive sensitivity, *Life Sci.*, 24 (1979) 1861-1868.
- 33 Moroni, F., Cheney, D.L., Peralta, E. and Costa, E., Opiate receptor agonists as modulators of  $\gamma$ -aminobutyric acid turnover in the nucleus caudatus, globus pallidus and substantia nigra of the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 207 (1978) 870-877.
- 34 Moroni, F., Peralta, E., Cheney, D.L. and Costa, E., On the regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid neurons in caudatus, pallidus and nigra: effects of opioids and dopamine agonists, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208 (1979) 190-194.
- 35 Agno, A. and Tarasco, C., Interactions between naloxone and GABA in the control of locomotor activity in the rat, *J. Neural Transm.*, 61 (1985) 137-149.
- 36 Joyce, E.M., Koob, G.F., Strecker, R., Iversen, S.D. and Bloom, F.E., The behavioural effects of enkephalin analogs injected into the ventral tegmental area and globus pallidus, *Brain Res.*, 221 (1981) 359-370.
- 37 Pycock, C., Horton, R.W. and Marsden, C.D., The behavioural effects of manipulating GABA function in the globus pallidus, *Brain Res.*, 116 (1976) 353-359.
- 38 Schell-Krüger, J., Magelund, G. and Olanas, M.C., Role of GABA in the striatal output system: globus pallidus, nucleus entopeduncularis, substantia nigra and nucleus subthalamicus. In: G. Di Chiara and G.L. Gessa (eds.), *GABA and the Basal Ganglia*, Raven Press, New York, 1981, pp. 165-186.
- 39 Kondo, Y. and Iwatsuro, K., Increased release of preloaded [ $^3\text{H}$ ]GABA from substantia nigra in vivo following stimulation of caudate nucleus and globus pallidus, *Brain Res.*, 154 (1978) 395-400.



## V

### DISCUSION CONJUNTA

NOTA: LOS RESULTADOS QUE SE DISCUTEN EN ESTA SECCION, SE REFIEREN A LA CITA CORRESPONDIENTE DE LAS PUBLICACIONES QUE FORMAN PARTE DEL TRABAJO DE TESIS (I, II Y III, VER SECCION DE RESULTADOS)

Como primer aspecto relevante del presente trabajo de tesis se muestra la implementación, optimización y ventajas del uso de un nuevo modelo de cánula diseñado en nuestro laboratorio (cánula de punta ranurada) - (ver citas: I, FIG. 2; II, Fig. 1). que, a diferencia del modelo tradicionalmente usado en la perfusión intracerebral (Gaddum-Myers), evita el contacto directo del tubo de infusión con la preparación y, además - permite una gran interfase de difusión entre el tejido y el medio de perfusión, aún usando tubos de diámetro pequeño ( mantenemos una superficie de interfase de difusión comparable a la obtenida con el modelo Gaddum-Myers mediante la apertura de dos ranuras laterales en la punta del tubo de extracción de la cánula, que permiten una extensa área de contacto entre el medio de infusión y la preparación).

Así, inicialmente intentamos evaluar las ventajas y desventajas metodológicas de las modificaciones introducidas en la geometría de la parte terminal de nuestro modelo de cánula con respecto al modelo Gaddum-Myers. Ya que el factor más común de falla experimental es la obstrucción del flujo del líquido infundido por la presencia de fragmentos de tejido y/o coágulos sanguíneos ( Bayón y Drucker-Colín, 1985; Redgrave, 1985), decidimos analizar la frecuencia de la ocurrencia de accidentes hidrodinámicos ( obstrucción) y vasculares (sangrado) como marcadores "físicos" de lesión durante el curso de la perfusión usando uno y otro modelo de cánula.

Nuestros resultados muestran que con el empleo de nuestro modelo de cánula como herramienta de perfusión, la incidencia de los episodios de sangrado se reducen a aquellos que se presentan en forma ocasional y, a los que casi inevitablemente ocurren después de la inserción aguda de la cánula ( la introducción inicial de ésta a través del parénquima nervioso invariablemente da origen a la ruptura de vasos pequeños, pero el sangrado que por esto se produce es de escasa magnitud y tiende a ceder en unos cuantos minutos ( ver citas: I, Tabla II; II, Tabla II). En igual forma, se favorece también una marcada disminución ( del 83% con el modelo Gaddum-Myers a 16% con nuestro diseño) en la incidencia de obstrucciones al flujo del líquido de perfusión (consideradas como aquellas en las que se produce un déficit en la recuperación del líqui-

do infundido mayor del 5% del total esperado por fracción colectada y que, invariablemente requieren de la extracción y limpieza de la cánula para subsanarlas) (ver también en citas: I, Tabla II; II, Tabla II).

La explicación más razonable para interpretar estos resultados parece radicar en que nuestro modelo de cánula de "punta ranurada", al minimizar los efectos traumáticos que por la circulación directa del líquido de perfusión se produce durante la perfusión (fenómeno que se favorece en el diseño Gaddum-Myers), reduce el desarrollo de la erosión y la consecuente lesión del tejido perfundido.

Colateralmente, otros autores también han diseñado y puesto a prueba modelos alternativos de cánulas que ofrecen la posibilidad de obtener un alto índice de perfusiones exitosas ( $\approx 90\%$ ) (Philippu y Col. 1973; Philippu, 1985; Iijima y Nunoki, 1985) (ver Fig. 5, sección de Generalidades y Antecedentes de la tesis), tratando también de evitar el contacto directo del tubo de infusión con el tejido. Sin embargo, su principal inconveniente radica en que la modificación introducida en la disposición geométrica de los tubos en la punta de la cánula (en comparación con el modelo Gaddum-Myers) reduce la superficie de interfase de difusión entre el medio de perfusión y el tejido, en función directa al tamaño del área que forma el corte transversal del tubo de extracción. Esto hace necesario, que, para aumentar y mantener una superficie de contacto comparable al modelo Gaddum-Myers, tengan que usarse tubos de diámetro mayor, generalmente inadecuados en la perfusión de cerebros de especies pequeñas, en donde frecuentemente se requiere la experimentación de estructuras neurales de tamaño reducido.

A este nivel de resultados es claro, que aunque con el uso de nuestro modelo de cánula estábamos en posibilidad de disminuir marcadamente la frecuencia de la ocurrencia de accidentes que lesionan al tejido y, por ende, la falla experimental de las perfusiones, no nos encontramos aún en condiciones de validar su uso como herramienta de perfusión, ya que era imprescindible conocer el grado de lesión y el estado funcional del tejido durante el curso de la perfusión con ambos

modelos de cánula.

Así, como primer paso nos propusimos valorar y validar la utilidad que ofrece la medición de la liberación en el perfusado de diversos " marcadores bioquímicos" que seleccionamos como posibles indicadores de daño y viabilidad y funcionalidad celular del tejido en perfusión.

#### VALIDACION DEL USO DE MARCADORES BIOQUIMICOS EN LA VALORACION DEL DAÑO TISULAR EN EL SITIO DE PERFUSION

Aunque diversos autores han empleado para estos fines la medición de un grupo heterogeneo de sustancias en el tejido nervioso, nuestra elección se centró fundamentalmente en la posibilidad de implementar ensayos de bajo costo que permitieran su medición en los perfusados en forma relativamente fácil y reproducible.

Nuestro diseño experimental se basó en el análisis de los siguientes parámetros metodológicos:

a). Utilidad de la medición de la liberación de los marcadores seleccionados en la detección y señalamiento de la ocurrencia de lesión del tejido durante la perfusión. Para tal fin, establecimos niveles de medición de los marcadores seleccionados ( ver a continuación) bajo condiciones "control" (en ausencia de la presentación de indicadores "físicos" de lesión). Una vez hecho esto, se determinaron valores experimentales de su liberación durante la ocurrencia de eventos que propiciaran la lesión del tejido; como es el caso de factores accidentales de tipo hidrodinámico (obstrucción en el flujo del líquido) o vasculares (sangrado) y, adicionalmente, por procedimientos intencionales del experimentador, mediante la introducción inicial de la cánula ( al comenzar el experimento) y/o por su extracción y re inserción voluntaria al final de la sesión.

b). Especificidad y confiabilidad de su liberación como consecuencia directa de la lesión del tejido. Tocante a este punto, se investigó en paralelo la posibilidad de aumentos en su liberación asociados a procedimientos que incrementan la actividad neural del tejido perfun-

dido mediante estímulos despolarizantes locales.

Material protéico total y deshidrogenasa láctica.- Inicialmente decidimos explorar la validez de usar la medición de la liberación de ambas sustancias como posibles marcadores de daño tisular durante la perfusión in vivo de regiones estriatales de la rata. Por un lado, las concentraciones de proteína total pueden ser fácilmente medidas en los perfusados debido a que sus niveles normales en el líquido extracelular del tejido nervioso son altos ( 0.6% de la proteína total del cerebro) (Hofstein y Col. 1983). Por otro lado, ya que la deshidrogenasa láctica (LDH) es una enzima soluble, compartamentalizada normalmente en el citoplasma celular, ha sido utilizada como "enzima de escape" en la valoración del daño tisular (Wroblewski y La Due, 1955). En el líquido extracelular y plasma sanguíneo se han reportado valores de actividad altos ( Diem y Lentner, 1970), sin embargo, estos son en casi un orden de magnitud menores que los determinados para la fracción citoplásmica (Hesse y Col. 1984). Con estos antecedentes en mente, como hipótesis de trabajo esperabamos que cambios en la concentración ( probablemente bruscos y de magnitud considerable) de ambos marcadores en el perfusado se encontraran relacionados y reflejaran la ocurrencia del daño celular (por lisis o edema) o alteraciones en la permeabilidad vascular ( por edema o ruptura de vasos ) en el tejido perfundido.

Nuestros resultados iniciales indicaron que el daño tisular es señalado por elevaciones importantes de los niveles " control" (condiciones " basales") del material protéico total y la actividad de la deshidrogenasa láctica en los perfusados. El daño mecánico inducido por la introducción inicial de la cánula, o por su extracción y reinserción voluntaria, invariablemente producen un incremento significativo en la liberación de los marcadores hacia el perfusado( ver en citas: I, Fig.3, Tabla I; II, Tabla I). Un aumento importante (aunque no tan dramático como en los casos anteriores) se obtiene también a consecuencia de la presentación de factores que accidentalmente lesionan al tejido perfundido ( sangrado u obstrucciones en el flujo del líquido con más del 5% de pérdida del volumen total de recolección espera--

do) (ver en cita I, Fig. 3). Estas observaciones sugieren que, bajo tales condiciones experimentales que producen la alteración de la integridad tisular del sitio de perfusión, la liberación y la recuperación aumentadas de los marcadores en el perfusado probablemente sea el reflejo de cambios importantes en la permeabilidad celular y vascular ( casi siempre hubo sangrado) que causan la "descompartmentalización" de sus sitios de almacenamiento tisular. Midiendo la liberación de proteínas específicas de tejido nervioso (S-100 y 14-3-2) y albúmina- $I^{125}$  de sangre como marcadores de daño neural y vascular en la perfusión, respectivamente, Honchar y colaboradores (1977) han sugerido que estas interpretaciones son plausibles.

Por otro lado, aún cuando parece clara la asociación entre aumentos paralelos en la liberación del material protéico total y la actividad de deshidrogenasa láctica con los parámetros "físicos" que señalan la lesión tisular, la medición en la liberación de ambos marcadores también puede ofrecer la oportunidad de detectar la ocurrencia de daño a la preparación aún en situaciones donde no es concurrente su presencia. Este hecho se ve apoyado por nuestra observación que demuestra que cerca del 10% de las elevaciones de los niveles de los marcadores detectadas en perfusiones individuales ( dato no mostrado en las publicaciones I y II) se presentaron en ausencia visible de accidentes vasculares e hidrodinámicos. La interpretación de estos resultados es difícil de precisar. Sin embargo, ya que nuestro animal de experimentación se encuentra consciente y en libertad de movimiento durante la perfusión, es factible pensar que cambios bruscos en la posición de su cabeza se acompañen de movimientos posicionales compensatorios del cerebro dentro de la cavidad craneal ( si tomamos en cuenta que el órgano flota en el LCR que lo baña). En tal instancia, este fenómeno aumentaría la probabilidad del desarrollo del daño a la preparación por los efectos traumáticos que la cánula produciría en la integridad del tejido que está en contacto directo con ella misma.

En extensión a los estudios antes mencionados, también se valoró la especificidad y confiabilidad de la liberación de los mismos marcadores en el señalamiento de la ocurrencia de accidentes que lesionan al

tejido. Nuestros resultados demuestran que solo los incrementos en -- los niveles de actividad de la deshidrogenasa láctica ( con respecto al valor " basal" control) se pueden utilizar con tales fines. Aunque la liberación del material protéico total aumenta a consecuencia de - la lesión tisular, su liberación también resultó ser evocada sistemá-- ticamente por la aplicación repetitiva de estimulaciones químicas des-- polarizantes (50 mM K<sup>+</sup>) que aumentan la actividad de disparo de las células nerviosas del tejido perfundido ( ver citas: I, Fig. 3, Tabla I ;II, Tabla,I). Como se discutirá a continuación con mayor detalle (ver liberación de proteína total y acetilcolinesterasa), este resul-- tado no es sorprendente, ya que existen antecedentes experimentales - (referidos en el inciso "D" de la sección de Generalidades y Antece-- dentes de la tesis) que orientan a pensar que tal fenómeno secretorio puede representar una propiedad funcional del sistema nervioso.

Adicionalmente, en contraposición a ~~nuestros~~ datos sobre la libera-- ción de deshidrogenasa láctica, debo hacer mención que algunos auto-- res han puesto en duda la especificidad del evento en el "marcaje bio-- químico" del daño tisular en el sistema nervioso. Con un sistema de perfusión análogo al nuestro, Greenfield y colaboradores (1983 b) han reportado en la sustancia nigra aumentos significativos en su libera-- ción por la aplicación local de concentraciones despolarizantes de po-- tasio. Sus datos sugieren que su liberación no es artificial , ya que una porción importante ( ≈ 50%) de la enzima liberada bajo estas con-- diciones parece derivarse y asociarse a la actividad de disparo de - las células nigroestriatales dopaminérgicas. Si el proceso secretorio de la enzima es exclusivo y conlleva algún significado funcional en dicha estructura, se desconoce aún. No obstante, nuestras observacio-- nes sugieren, que al menos en las regiones estriatales exploradas en nuestro estudio ( núcleo caudado y globus pallidus), no existen incre-- mentos en su liberación dependientes de aumentos en la actividad neu-- ral del área de perfusión y, por lo tanto, la medición de su libera-- ción es confiable para valorar el daño tisular de nuestra preparación.

En base a que los resultados iniciales con estos dos marcadores nos -

indicaban que únicamente los incrementos en la liberación de deshidrogenasa eran representativos y se relacionaban con especificidad a la ocurrencia de lesión tisular en nuestra preparación, decidimos - extender paralelamente en nuestro estudio la valoración de la utilidad en la medición de la liberación en el perfusado de otras dos actividades enzimáticas hipotéticamente propuestas como marcadores de daño tisular en el sistema nervioso (Lajtha, 1983).

Acetilcolinesterasa (AChE) y proteasas. La elección de estos marcadores se basó en los siguientes hechos: por un lado, la AChE presenta una distribución tisular amplia en el sistema nervioso central. Del total de la poza neuronal, un tercio aproximadamente se encuentra unida a la membrana (Rotundo y Frambough, 1980 a y b). El resto de la - fracción celular es soluble, citoplasmática. En el plasma sanguíneo se han reportado niveles de actividad altos y, comparados con los valores obtenidos en el líquido de perfusado de algunas estructuras - cerebrales (sustancia nigra y núcleo caudado), son en casi dos ordenes de magnitud mayores (Greendield y Col. 1983a). En cuanto a la actividad de proteasa, nos basamos en el hecho de que ésta se encuentra mayoritariamente confinada y compartamentalizada a nivel de estructuras que participan normalmente en la degradación proteolítica intracelular (lisosomas) (Lajtha, 1983). Así, al igual que con nuestros -- dos marcadores de lesión inicialmente estudiados, también esperabamos que la ocurrencia del daño tisular en el tejido perfundido se señalara por aumentos en la liberación de estas actividades enzimáticas en el perfusado.

Nuestros resultados mostraron que la medición de la actividad de los dos marcadores en el perfusado es útil en el señalamiento de la - lesión del tejido. Así, el trauma mecánico intencionalmente inducido al tejido en perfusión (extracción y reinserción voluntaria de la - cánula) produce un incremento importante (con respecto al valor "basal" control) de la liberación de ambas actividades enzimáticas (ver en citas: I, Tabla I; II, Tabla I). Al igual que para la proteína total



y deshidrogenasa láctica, el aumento súbito en la liberación de ambas actividades enzimáticas muy probablemente refleja el "escape" que sufren a consecuencia del daño celular y vascular que alteran su compartimentalización. De hecho, en comparación con los niveles de proteína total y deshidrogenasa láctica liberados durante la lesión, la magnitud del incremento (expresado como el % de aumento sobre el valor basal promedio) observado para estas actividades enzimáticas fue generalmente más bajo. Esta situación probablemente refleja la heterogeneidad de los niveles de nuestros marcadores en el tejido.

Sin embargo, mediante nuestra "prueba" de especificidad de marcaje de lesión tisular, solo la liberación de la actividad de proteasas demostró una asociación exclusiva con este evento, ya que la de la actividad de acetilcolinesterasa, aunque también se indujo por la lesión del tejido de perfusión del globus pallidus y núcleo caudado, su liberación también pudo ser evocada por nuestras condiciones despolarizantes con alto potasio en la última estructura (ver en citas: I, Tabla I; II, Tabla I). El último resultado no fue del todo novedoso para nosotros, ya que algunos reportes experimentales han demostrado la liberación evocada de esta actividad enzimática en distintas preparaciones in vitro e in vivo de tejido nervioso (inciso "D" sección de Generalidades y Antecedentes). Más aún, Greenfield y Col. (1980, 1983a) han demostrado en una preparación de perfusión intracerebral in vivo de gato anestesiado, la coincidencia temporal de la secreción de proteína total y AChE durante la despolarización del tejido neural de la sustancia nigra y núcleo caudado con altas concentraciones de potasio. Así, por lo consiguiente, nuestros resultados sobre la liberación evocada por estímulo despolarizante de AChE y proteína total (inicialmente propuestos como marcadores de lesión tisular), confirman y extienden las observaciones de estos autores a la región caudopalidal de la rata en libertad de movimiento.

En vista de que una parte importante del estudio realizado en el presente trabajo de tesis se abocó subsecuentemente a la exploración de

la liberación protéica bajo condiciones despolarizantes del tejido de perfusión, más adelante discutiremos por separado lo pertinente a este cuerpo de información.

En resumen, tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que solo los aumentos en la liberación de la actividad de deshidrogenasa láctica y, menos ostensiblemente la de proteasa, pueden ser usados con especificidad y confiabilidad como indicadores bioquímicos que señalen la ocurrencia de daño tisular durante el curso de la perfusión in vivo. Para tal propósito, no nos resultaron útiles la medición de los niveles de material protéico total y acetilcolinesterasa que inicialmente propusimos como marcadores de daño tisular, ya que, aunque también logramos observar aumentos considerables de sus niveles en el perfusado por la ocurrencia de dicha contingencia en la preparación, también obtuvimos incrementos (a pesar de que no son tan marcados como los provocados por la lesión del tejido) importantes a consecuencia de la aplicación de estímulos despolarizantes en el tejido perfundido.

VALIDACION DEL USO DE MARCADORES BIOQUIMICOS  
EN LA VALORACION DE LA VIABILIDAD Y FUNCIONALIDAD  
TISULAR EN EL SITIO DE PERFUSION.

A este nivel de resultados, es claro que aunque ya estábamos en posibilidad de disponer de parámetros "físicos" y "bioquímicos" medibles para detectar con confiabilidad la ocurrencia de daño tisular a nuestra preparación, no contábamos con indicadores que nos permitieran registrar el grado de viabilidad y funcionalidad del tejido a lo largo del curso temporal del experimento (usualmente la duración de cada sesión de perfusión era aproximadamente de seis horas). Desde el punto de vista electrofisiológico, uno de los procedimientos experimentales que se ha implementado para valorar dichos parámetros funcionales durante la perfusión se ha basado en el registro de la respuesta eléctrica (actividad de disparo) neuronal evocada por la estimulación despolarizante (Hesse y Col. 1984). Sin embargo, ya que en el sistema

nervioso este evento electrofisiológico se acompaña generalmente de la liberación de mensajeros químicos, nos propusimos usar y validar como "prueba" de exploración de la viabilidad y funcionalidad de nuestra preparación el examen de la capacidad que exhibiría el tejido perfundido para liberar este tipo de agentes neuroactivos durante el curso de la perfusión. Para tal propósito, seleccionamos medir (simultáneamente y comparativamente) la liberación evocada por la aplicación de estímulo químico despolarizante (50mM K<sup>+</sup>) de GABA-H<sup>3</sup> (cargado exógenamente al tejido) y de encefalina endógena en el globus pallidus, ya que aquí, dichas sustancias exhiben funciones transmisoras y niveles de concentración abundante (lo que aumenta la probabilidad de obtener incrementos de liberación importantes que faciliten su detección óptima en el perfusado).

Nuestros resultados demuestran que la medición de la liberación de ambos transmisores en el perfusado es un parámetro útil para registrar el grado de viabilidad y funcionalidad del tejido durante el curso de la perfusión. Así, la estimulación repetitiva con altas concentraciones de potasio (usualmente a las 3.5 y 5.5 horas después de haberse iniciado la perfusión) produjo incrementos importantes en la liberación de los dos transmisores (ver en citas: I, Fig. 4; II, Tabla I). No obstante, el análisis comparativo entre la magnitud del valor del aumento de GABA-H<sup>3</sup> obtenido en la primera estimulación (3.5 hr), con respecto a la segunda (5.5 hr), nos mostró un decremento sistemático en los niveles de liberación del aminoácido en la última condición experimental. Ya que en la encefalina endógena observamos paralelamente una respuesta estable al evocar su liberación por el mismo procedimiento químico, este fenómeno probablemente no se relaciona a un daño tisular progresivo que disminuye el área de tejido viable en el sitio de perfusión durante el curso del experimento. Así, la interpretación más lógica para explicar el decremento en la respuesta liberadora del aminoácido parecería radicar en que si tomamos en cuenta que una vez que ha sido cargado y captado por las células nerviosas, este se encuentra sujeto a procesos catabólicos y de redistribución que derivan la marca hacia otros metabolitos y compartimientos subcelulares con el consecuente agotamiento de las pozas tisulares de

almacenamiento a partir de las cuales se libera (Tapia, 1976; Gauchy y Col. 1977). De hecho, nuestros experimentos sobre la identidad de la marca orientan a pensar en tal sentido, ya que a las tres horas de perfusión, el 60% de la radioactividad liberada en condiciones basales corresponde al GABA, proporción que se ve reducida al 30% después de la sexta hora. Dentro de este contexto, cabe hacer mención que otro fenómeno concurrente que coadyuvaría a disminuir progresivamente la disponibilidad tisular del aminoácido marcado para su liberación, estaría dado por el agotamiento que induce su propia liberación "espontánea" (condiciones "basales") a lo largo del curso temporal de la perfusión.

En extensión a los resultados antes citados, con el objeto de validar la especificidad y confiabilidad que nos ofrece la medición de la liberación de estos transmisores en la evaluación de la viabilidad y funcionalidad tisular, también medimos su liberación bajo condiciones de daño tisular. A pesar de que nuestros resultados demuestran la presencia de incrementos importantes en la liberación de ambas sustancias, que se asocia y señala la ocurrencia de daño tisular (lo cual era de esperarse por la lisis celular que puede suceder en esta circunstancia), su liberación en respuesta a la estimulación química despolarizante generalmente fue (aunque a veces se observó una recuperación parcial en la respuesta) bloqueada después de la incidencia de trauma mecánico que dañara a la preparación (sangrado u oclusión con déficit >5% en la recuperación del líquido de perfusión).

Por lo anteriormente expuesto, los cambios de la respuesta en la liberación evocada de encefalina endógena durante la perfusión parecen representar un indicador adecuado para la valoración de los cambios en la funcionalidad y responsividad del tejido neural durante el curso de la perfusión in vivo del globus pallidus. Con el mismo propósito puede ser usada la medición de la liberación evocada por estímulo químico despolarizante del GABA- $H^3$  cargado exógenamente al tejido. Sin embargo, debido al hecho de que el decremento en su liberación por estimulación despolarizante sea probablemente el reflejo de su "agota-

niento" tisular, proponemos una utilidad secundaria en el marcaje de la viabilidad de nuestra preparación durante la perfusión.

Así, los resultados sobre la medición de la liberación de marcadores que específicamente nos permitían registrar el daño y la viabilidad tisular nos indicaban que ya estábamos en posibilidad de llevar a cabo el estudio de validación del uso de nuestro modelo de cánula de punta ranurada como herramienta de perfusión. Así, los dos tipos de cánula (el nuestro y el modelo Gaddum-Myers) fueron comparados paralelamente en relación al daño y la viabilidad del tejido durante la perfusión en ausencia de accidentes vasculares e hidrodinámicos. Con tal fin, utilizamos la medición de la actividad de deshidrogenasa láctica liberada al perfusado en condiciones "basales" (no estimulación) como marcador bioquímico específico de lesión, y la liberación "basal" y "estimulada" de GABA-H<sup>3</sup> exógeno y encefalina endógena como indicadores bioquímicos para registrar la viabilidad y funcionalidad del tejido de perfusión.

Nuestros resultados muestran, por un lado, que el promedio de las actividades de deshidrogenasa láctica obtenidos en los perfusados en condiciones basales con el modelo Gaddum-Myers no es significativamente diferente al estimado con el uso de nuestro modelo ( $1.5 \pm 0.7$  u/ml y  $1.1 \pm 0.6$  u/ml, respectivamente) (ver en cita I, Fig. 5; II, Tabla II). Por otro lado, en cuanto a la valoración de la funcionalidad y viabilidad del tejido con cada una de las cánulas, los resultados indican que la liberación basal y estimulada de GABA-H<sup>3</sup> y encefalina son similares con el uso de ambos modelos durante el transcurso de cinco horas de perfusión (ver en citas: I, Fig. 5; II, Tabla II). En vista de que no pudieron ser detectadas diferencias cuantitativas en los parámetros funcionales medidos, nuestros resultados, tomados en conjunto, sugieren que a pesar de las marcadas diferencias en la frecuencia de lesiones accidentales (sangrado y obstrucciones en el flujo del líquido) que se observan durante las perfusiones con los dos modelos de cánula (significativamente menores con nuestro diseño), el daño constante y paulatino, producido predominantemente por el trauma

meccánico que la circulación del líquido ejerce sobre el tejido con su consecuente erosión durante la perfusión (en ausencia de accidentes), se mantiene estable y es comparable con el uso de ambas cánulas.

Paralelamente, consideramos la posibilidad de que la disminución de la frecuencia de las oclusiones (ventaja buscada) lograda con nuestro modelo de cánula pudiera ser debida a la existencia de un corto-circuito (una desventaja no buscada) en la circulación del líquido en la punta de la cánula, que trajera consigo una baja eficiencia de difusión entre el medio de perfusión y el tejido y/o viceversa. En función de esto, con el objeto de evaluar la variable de difusión tejido-medio de perfusión, decidimos comparar la eficiencia de ambos modelos para muestrear (recolectar) un marcador bioquímico tisular endógeno durante la perfusión. Ya que el material protéico total recuperado en los perfusados en condiciones basales y en ausencia de daño mecánico tisular accidental es representativo en gran parte del que se encuentra presente normalmente en el líquido extracelular (y no de daño tisular) (Greenfield y Col. 1983a; Hofstein y Col. 1983), y presenta niveles estables durante el curso de la perfusión (al menos hasta las seis horas de experimentación), decidimos emplearlo como indicador de eficiencia de recolección de nuestras dos cánulas. También, con el fin de evaluar la variable de difusión medio de perfusión-tejido, valoramos la eficiencia de ambas cánulas para liberar solutos hacia el tejido perfundido. Para esto, empleamos la medición de la captación tisular del GABA-H<sup>3</sup>, ya que el transmisor es adicionado exógenamente al tejido.

Nuestros resultados indican que no existe una diferencia cuantitativa significativa en los niveles de proteína recogida en los perfusados con el empleo de ambos modelos de cánula (30 ± 12 µgr/ml para el Gaddum-Myers y 35 ± 15 µgr/ml para el nuestro) (ver citas: I, Fig. 5; I, Tabla II). Por otro lado, nuestros resultados también muestran que la capacidad de difusión del GABA-H<sup>3</sup> hacia el tejido es muy similar con el uso de ambos modelos de cánula (un valor promedio de captación del 28 ± 5% del total del cpm del aminoácido cargadas al tejido se obtuvo para el Gaddum-Myers y 29 ± 6% para el nuestro) (ver en cita

II, Tabla II). Estas observaciones sugieren que, aún sin excluir la posibilidad de que el corto-circuito del líquido de perfusión sea una condición implícita en la punta de nuestra cánula, los efectos que sobre la eficiencia de ésta pudiera producir serían despreciable, ya que no alteran los parámetros de difusión medio de perfusión/tejido y tejido/medio de perfusión medidos en nuestro estudio. Así, en resumen podemos concluir que el uso de nuestro modelo de cánula de punta ranurada como herramienta de perfusión ofrece como principal ventaja el reducir la incidencia de accidentes que lesionan al tejido durante la perfusión, manteniendo la misma eficiencia de muestreo (difusión tejido-medio) e "infusión" (difusión medio-tejido) del diseño Gaddum-Myers. Concomitantemente a estas ventajas experimentales, el número de perfusiones exitosas aumenta con nuestro diseño.

#### LIBERACION DE MATERIAL PROTEICO TOTAL Y ACETILCOLINESTERASA

Como ya se mencionó con anterioridad, los aumentos en la liberación de material protéico total y actividad de acetilcolinesterasa en el perfusado no resultaron ser inducidos específicamente por la ocurrencia de lesión tisular a la preparación, ya que la liberación de ambos compuestos también fue facilitada a consecuencia de la aplicación local de estímulo químico ( $50\text{mM K}^+$ ) despolarizante en el núcleo caudado, solo de proteína total, en el globus pallidus de nuestro modelo animal de estudio (rata).

priori, estos resultados sugieren inmediatamente las siguientes interrogantes:

). Por las implicaciones funcionales que la liberación protéica tendría en el sistema nervioso, ¿ Realmente la identidad química del material reactivo a Lowry es de naturaleza protéica?

). De ser así, ¿ Los aumentos en la liberación de estos compuestos químicos representa un evento fisiológico (y no artificial), esto es, con consecuencia directa del incremento de la actividad del tejido

nervioso o, en otros términos, liberados específicamente por la despolarización del mismo?

c). En tal instancia, ¿Dependería su liberación de la presencia del calcio en el medio extracelular, como ya se ha descrito para la liberación evocada por despolarización de mensajeros con función transmisora en el sistema nervioso?

d). Si éste fuera el caso, ¿Que población celular, al menos en las regiones estudiadas, sería la responsable de su liberación y cuales serían los mecanismos a través de los cuales se realiza?

e). ¿Es posible que así como el tejido lo libera bajo condiciones que lo despolarizan, también lo haga en forma "espontánea", esto es, como consecuencia de la actividad neural de base (no estimulación), como en el caso de sustancias con función transmisora probada?. Si éste es el caso, ¿Que interpretación(es) experimental(es) tendrían nuestros niveles de liberación " basal" control? ¿Seguirían siendo fieles signos también como parámetro que refleja lesión tisular por la erosió*o*n que el líquido de perfusión produce en el tejido durante la perfusión?

f). Por último, si la liberación de estos compuestos representa un evento fisiológico probable implícito en el sistema nervioso (como ya se han postulado otros autores), ¿Que significado(s) funcional(es) tendría(n) en el mismo?

Con tal formato de preguntas en mente, a continuación trataré de discutir por separado lo pertinente a cada una de ellas.

g). Existe la posibilidad de que la presencia de material no proteico en el perfusado (ejemp. alta fuerza iónica de sales, catecolaminas, aminoácidos, etc.) contribuya a la reacción de Lowry (Chou y Goldstein, 1960; Bensadoun y Weinstein, 1976) y, por lo consiguiente, nuestros valores de material proteico total estimados por el método no sean reales, sino más bien se encuentren sobreestimados por un artificio



metodológico del ensayo. Sin embargo, dos hechos posibilitan afirmar que, aunque sin excluir la posibilidad de la injerencia del arteficio del ensayo en nuestras determinaciones, la naturaleza protéica de al menos una porción de nuestros valores de proteína total estimados en el perfusado es casi segura: detección por nosotros (dato no mostrado en -- las publicaciones I y II) y por otros autores (Drucker-Colín y Col. 1975) de múltiples componentes mediante procedimientos electroforéticos en géles de poliacrilamida con métodos de tinción comúnmente empleados en la identificación de proteínas (ejemp. azul de comassieu y nitrato de plata) ; medición concomitante por el Lowry (Lowry y Col. 1951) y Bradford (1976), ensayos que operan a través de diferentes principios químicos en la determinación de proteínas, de niveles de liberación "basales" (condiciones control) y , más aún, de incrementos significativos de estos por la despolarización local del tejido con alto potasio ( ver nuestro resultado de la Fig. 2 en la cita I).

). Se ha puesto en duda la utilidad del empleo de altas concentraciones de potasio como procedimiento experimental para estudiar la especificidad de la liberación de transmisores en el sistema nervioso. Por otro lado, algunos autores (Lorenzo y Col. 1975) han sugerido que dicho procedimiento puede favorecer el desarrollo de cambios importantes en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. En tal instancia, ya que los niveles plasmáticos de la actividad de acetilcolinesterasa y la concentración de proteína total son significativamente mayores que los del líquido extracelular cerebral (Greenfield y Col. 1983a), podríamos plantear la posibilidad de que el incremento ( o al menos una porción del mismo) evocado en la liberación de ambos compuestos en el perfusado por la administración de la alta concentración de potasio( ejem. 50 mM) se debiera, además de a la despolarización nerviosa, a la contaminación plasmática inducida por un posible cambio en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica del tejido en perfusión. Desde este punto de vista, en nuestros resultados no podemos excluir la posible participación de dicho fenómeno, fundamentalmente porque no se implementó la medición concomitante de la liberación de "marcadores bioquímicos" mayoritariamente compartamentalizados en el

espacio intravascular durante las condiciones despolarizantes. No obstante esto, en apoyo a nuestras observaciones, Greenfield y colaboradores (1980 y 1983a) que también han reportado incrementos paralelos en la liberación in vivo de acetilcolinesterasa y proteína total evocados por un procedimiento despolarizante análogo al nuestro (alto potasio) en la sustancia nigra del gato anestesiado, sugieren que, aunque el alto potasio favorezca el desarrollo de una permeabilidad vascular aumentada en el tejido perfundido, su contribución para explicar el incremento de los niveles de ambos compuestos en el perfusado sería despreciable, ya que los niveles de liberación (medidos también durante la misma condición despolarizante) de la colinesterasa inespecífica (la cual representa el 50% del total de la población de las colinesterasas plasmáticas y cuyos valores de actividad son 140 veces mayores que los determinados en el perfusado bajo condiciones de reposo) no sufren cambios significativos durante la despolarización con el ión. En apoyo a esta propuesta, los mismos autores (Greenfield y Col. 1983a) demostraron que la actividad específica de la acetilcolinesterasa, cuyo valor es significativamente más alto en el perfusado de condiciones "basales" que en el plasma, tampoco sufre alteración alguna por la manipulación despolarizante (un decremento de tal valor se esperaría si hubiera un "escape" de la enzima al espacio intravascular por una permeabilidad hematoencefálica aumentada). En nuestro laboratorio hemos obtenido evidencias experimentales adicionales que orientan a pensar también en el origen neural del material protéico liberado. Los resultados de Oksenberg y colaboradores (Tesis, 1987) y Leff y colaboradores (Tesis, en preparación) demuestran que al menos una porción de la proteína total liberada por la despolarización con alto potasio puede ser sintetizada a partir de aminoácidos radiactivos precursores inyectados en el estriado de rata. Sin embargo, es evidente que otros procedimientos despolarizantes (ejem. estimulación eléctrica, neurotoxinas como la veratrina que aumenta la conductancia al sodio, etc.) deben ser utilizados colateralmente para valorar la especificidad fisiológica de la liberación neural de estos compuestos. En adición a este último punto, nuestros resultados también demuestran incrementos en la liberación estriatal de proteína total evocados por la administración sistémica (intraperito-

neal) de drogas que aumentan la actividad de disparo neuronal (metrazol) (ver en cita II, Fig.3).

Por otro lado, y en extensión al cuerpo de información antes mencionado, algunos autores han planteado que la liberación evocada por la despolarización con alto potasio podría representar también un evento artificial más que fisiológico, en vista de que el aumento de los niveles de concentración del catión en el medio extracelular de preparaciones aisladas de tejido nervioso produce edema y probable lesión celular (Roberts y Col. 1979). Si bien es cierto que, en nuestros estudios no se efectuaron controles histológicos sistemáticos del tejido perfundido para detectar la posible ocurrencia de este fenómeno, debido fundamentalmente a que sería prácticamente imposible de distinguir entre el grado de lesión edematosa que se produciría en el tejido por la circulación constante del líquido durante la perfusión a aquella que sería específicamente inducida por la elevación de la concentración del catión. Sin embargo, nuestros resultados demuestran una ausencia de incrementos significativos de la liberación de la actividad de la deshidrogenasa láctica durante la despolarización con el alto potasio. Resultados similares han reportado Greenfield y colaboradores (1983a) también con el empleo de la medición de la misma actividad enzimática liberada al perfusado en el control de la especificidad fisiológica de la liberación evocada por el alto potasio de acetilcolinesterasa y proteína total en la sustancia nigra del gato anestesiado. Estas observaciones, aunque no excluyen la posible ocurrencia de este tipo de daño celular ocasionado por el alto potasio en preparaciones de tejido de perfusión in vitro, si sugieren que al menos en nuestro modelo experimental in vivo, sus efectos sobre la participación en el aumento de la liberación evocada de acetilcolinesterasa y proteína total serían de poca importancia.

En apoyo a estas interpretaciones, nuestros resultados también muestran una diferencia en los perfiles de los cambios evocados en la liberación de proteína total y actividad de acetilcolinesterasa en el núcleo caudado y globus pallidus (ver en citas: I, Tabla I; II, Tabla I), ya que en la última estructura no se obtuvieron incrementos

significativos en la liberación de la actividad enzimática asociados a los de proteína total por la aplicación local del alto potasio. Estas observaciones sugieren la exclusión de un fenómeno artificial uniforme del alto potasio en la facilitación de la liberación de estos compuestos.

Así, todas las evidencias experimentales presentadas con anterioridad orientarían a pensar, en conjunto, que los incrementos en la liberación de la actividad de acetilcolinesterasa y proteína total son consecuencia, al menos en parte, del efecto despolarizante que la alta concentración de potasio produce en el tejido nervioso en perfusión.

c). En nuestros estudios iniciales sobre la liberación de la actividad de acetilcolinesterasa y proteína total no investigamos el efecto que la omisión de calcio en el medio de perfusión produce sobre la respuesta liberadora de ambos compuestos evocada por el alto potasio. Como justificante de tal situación debo mencionar que se debió fundamentalmente al hecho de que la medición de su liberación se enfocó primariamente como un parámetro de valoración experimental hipotético de la ocurrencia de daño tisular en la preparación. Sin embargo, sí se exploró ulteriormente la dependencia de calcio de la liberación evocada de proteína total por el alto potasio. Nuestros resultados indican un decremento parcial ( $\approx 60\%$ ) en la magnitud de la respuesta control (alto potasio en presencia de calcio en el medio de perfusión) cuando se omite la aplicación del catión durante la despolarización (ver en cita II, Fig.4). A priori, el resultado sugiere que al menos una porción del material liberado en la condición control ( $\uparrow K^+ Ca^{++}$ ) dependería de la existencia extracelular del catión en el tejido de perfusión, lo cual refuerza aún más la especificidad de la liberación proteica que se evoca por este procedimiento despolarizante y permite dilucidar el probable origen celular de la proteína liberada (ver más adelante el inciso "d"). Sin embargo, algunos autores (Van der Heyden y Col. 1985) han objetado la omisión del calcio en el medio de perfusión, como procedimiento confiable para lograr una depleción eficiente in vivo de los niveles extracelulares del catión en el tejido de perfusión. Desde este punto de vista, se plantea que, a diferen-

cia de la perfusión de preparaciones in vitro ( en donde generalmente la respuesta liberadora evocada por la despolarización con alto potasio es abolida en ausencia de calcio en el medio de perfusión), en la perfusión de preparaciones in vivo siempre hay que contar con el transporte continuo del catión hacia el área de perfusión a partir del tejido circunvecino. En base a esto, con el objeto de minimizar en lo posible la injerencia de dicho fenómeno sobre la evaluación de la dependencia del calcio de nuestra respuesta de liberación de proteína total, empleamos la administración constante y simultánea de EGTA ( agente quelante del catión) en el líquido de perfusión durante las despolarizaciones con el alto potasio en ausencia de calcio. En apoyo a la posible utilidad de este procedimiento metodológico mixto ( omisión de calcio+EGTA en el medio de perfusión) para asegurar la dependencia de calcio de nuestra respuesta liberadora ( al menos de una porción de la misma) de proteína total, otros autores ( Greenfield y Col. 1983a) que no emplearon agentes quelantes del catión reportan una retención importante del incremento evocado en la misma por el alto potasio en ausencia de calcio.

). Así, basados en la acepción general de que únicamente la liberación neuronal ( y no glial) evocada por despolarización de agentes neuroactivos con función transmisora es dependiente de la presencia de calcio en el medio extracelular, nuestro resultado que muestra una liberación de proteína total parcialmente dependiente nos posibilita plantear la hipótesis de que existan cuando menos dos poblaciones de proteínas liberables in vivo , que se liberarían a partir de elementos celulares distintos en el estriado de la rata: neuronas y glía. De hecho, la demostración de la liberación proteica en preparaciones in vitro de cultivos de células neuronales ( Sweadner y Col. 1981 y 1983) y gliales (Arenander y de Vellis, 1980 y 1981 a y b) apoyarían esta propuesta. In vivo , el modelo neural del sistema nigro-estriatal dopaminérgico de liberación de acetilcolinesterasa es el que más ha posibilitado el estudio del origen y los mecanismos de liberación proteica. Con la lesión química unilateral de esta vía con la neurotoxina 6-hidroxidopamina, Greenfield y colaboradores (1983b) reportaron un decremento del 85% en la tasa de liberación "espontánea" de la

enzima en la sustancia nigra, el cual se correlaciona en paralelo con una depleción del contenido tisular de dopamina. Con dicho resultado, los autores sugieren que la acetilcolinesterasa liberada en esta estructura derivaría casi exclusivamente de las células nigroestriatales dopaminérgicas. Esta propuesta se ve corroborada por los hallazgos que demostraron una inhibición total de la respuesta liberadora de la enzima evocada por el alto potasio bajo dos circunstancias experimentales: ausencia de calcio en el medio de perfusión; y lesión de la vía nigro-estriatal dopaminérgica ( Greenfield y Col. 1983b). Mediante el mismo procedimiento de lesión este grupo de trabajo ha reportado que en el núcleo caudado, la magnitud de la reducción de la tasa de liberación "espontánea" de la enzima es de cerca del 70%, el cual se corresponde con el decremento producido en la liberación de ella en la misma región neural por la aplicación nigral de alto potasio. Estos resultados sugieren, entonces, que cerca del 70% de la acetilcolinesterasa liberada en el caudado tendría un origen presináptico, a partir de las terminales nigroestriatales dopaminérgicas. Los datos se ven ampliados por los estudios que demuestran la asociación de los incrementos de la liberación de la enzima con la activación del sistema nigro-estriatal dopaminérgico por el agonista dopaminérgico anfetamina (Greenfield y Shaw, 1982). Así, cuando se administra el fármaco en la sustancia nigra, la liberación "espontánea" de la enzima muestra un incremento local importante y una disminución en el núcleo caudado ipsilateral . De hecho, en base a que las modificaciones inducidas en la liberación de la enzima por la activación del sistema nigro-estriatal dopaminérgico son análogas a aquellas que se observan en la liberación de dopamina por la aplicación nigral de anfetamina (Leviel y Col. 1979), se ha propuesto un estrecho paralelismo entre la liberación de estos dos compuestos. Tres observaciones parecen corroborar este planteamiento al menos en la sustancia nigra: sitios de almacenamiento intracelular común en el retículo endoplásmico rugoso de las dendritas de las células nigroestriatales dopaminérgicas (Mercer y Col. 1979; Liesli y Col. 1980) ; liberación "espontánea" a partir de las mismas estructuras subcelulares que no es bloqueada por tetrodotoxina (TTX) y; liberación estimulada por el alto potasio que es dependiente de la presencia de calcio en el medio de perfusión

(Greenfield y Col. 1984).

Por otro lado, en cuanto a los mecanismos participantes en la liberación del material protéico, poco es lo que se conoce aún de ellos. Sin embargo, se podrían plantear formas alternativas hipotéticas a partir de las cuales las proteínas podrían ser liberadas en el sistema nervioso:

1. Se puede pensar que al igual que para el material protéico secretado por las células endocrinas o neuroendocrinas, la proteína liberable en el tejido nervioso sería sintetizada y empacada ulteriormente en vesículas secretorias de las neuronas, a partir de las cuales se liberaría por el proceso de exocitosis en forma dependiente de calcio. En esta instancia cabrían dos posibilidades: sitio de almacenamiento vesicular común con agentes neurotransmisores y/o independientes. Como ejemplo de la primera opción podemos citar el caso de las cromograninas y la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa, las cuales se almacenan y liberan junto con la norepinefrina a partir de los gránulos cromafines en forma dependiente de calcio en las sinapsis adrenérgicas de la médula adrenal ( De Potter y Col. 1969a).

2. Existe también la posibilidad de que el material protéico liberable no se almacene en vesículas secretorias sino más bien se encuentre confinado en pozas solubles citoplásmicas ( como en el caso de transmisores como el GABA), a partir de las cuales se liberaría en forma independiente, pero concomitante con transmisores vesiculados, o, por la despolarización nerviosa en presencia de calcio.

3. Como lo han demostrado Henderson y Greenfield (1984) para la liberación de acetilcolinesterasa y dopamina a partir del retículo endoplásmico de las dendritas de las células nigroestriatales dopaminérgicas de la sustancia nigra, es posible también que algunas proteínas neurotransmisores sean coalmacenados y coliberados de compartimientos subcelulares membranales no vesiculados en forma dependiente de calcio.

4. En función de los reportes de algunos autores (Richter-Landsberg y Col. 1984; Sweadner, 1981 y 1983 a y b), es factible que exista una población de proteínas que asociadas a la membrana plasmática neuronal sean liberadas al medio extracelular a través de un mecanismo de proteólisis secuencial y limitada en forma dependiente de calcio.

5). De si los niveles de liberación "basal" (no estimulados por des-polarización) de acetilcolinesterasa y proteína total reflejan realmente un proceso de secreción "espontánea", fisiológico, dependiente de la actividad neural de base, es difícil dilucidar con nuestro procedimiento de perfusión in vivo, ya que siempre hay que contar con la liberación constante de estos compuestos inducida a partir de lesión tisular que la circulación del líquido de perfusión produce sobre el tejido durante la perfusión. En estas condiciones, con un sistema de perfusión intracerebral in vivo, Honchar y colaboradores (1979) han estimado una tasa promedio de daño neural de 1.09 µgr de tejido húmedo/minuto de perfusión y una contaminación sérica de 2.0 l/ minuto de perfusión en el área perfundida. Sin embargo, existen evidencias experimentales que posibilitan afirmar que al menos una porción del material protéico y de acetilcolinesterasa son liberados in vivo como consecuencia de la actividad nerviosa "espontánea". Greenfield y colaboradores (1983a) demostraron con un sistema de cuatro cánulas implantadas simultáneamente en el cerebro del gato anestesiado (dos en ambos núcleos caudados y otras dos en la sustancia nigra), que la aplicación nigral unilateral del alto potasio evoca como respuesta distal una reducción del 30-50% de los niveles de liberación basal de proteína total y de acetilcolinesterasa en la sustancia nigra contralateral. Así, los autores sugieren que al menos un 30% de los niveles de liberación basal de los dos compuestos puede ser el resultado de la actividad neuronal "espontánea" de esta estructura.

6). En el momento actual, es aún desconocido con certeza el (los) significado (s) funcional (es) de la liberación de material protéico en el sistema nervioso. No obstante la diversidad y el número de



especies protéicas que forman su composición (no publicado), con algunas de ellas se ha logrado un nivel de caracterización bioquímica y funcional que nos permiten vislumbrar la complejidad de las funciones que probablemente ejerzan en la homeostásis de la fisiología nerviosa. Algunas probables acciones "tipo" se describirán a continuación:

.. Neuromodulación de la transmisión nerviosa. Diversas líneas experimentales parecen apoyar la idea de que las enzimas liberadas al espacio extracelular podrían potencialmente ejercer, independientemente de su acción hidrolítica sobre su sustrato específico, acciones modulatorias sobre la actividad nerviosa a través de distintos mecanismos. Un ejemplo bien documentado de esta acción "tipo", lo encontramos representado por la acetilcolinesterasa la cual produce, por un lado, respuestas modulatorias inhibitorias a largo plazo sobre la actividad de disparo de las células nigroestriatales dopaminérgicas (Greenfield Col. 1983b); adicionalmente se le han asignado acciones modulatorias indirectas, probablemente a través de la modificación de la transmisión peptídica, ya que existen evidencias experimentales que indican para ella, una clara actividad de peptidasa en la hidrólisis de susstratos peptídicos tales como sustancia P y encefalinas, o aún en la liberación de estas últimas a partir de su precursor (Chubb y Col. 1980 y 1983). Así, las proteínas, en adición a facilitar varias formas de transmisión peptidérgica, también podrían desempeñar un papel protagónico en la inactivación de neurotransmisores en el espacio extracelular.

. Acciones "tróficas". Otra posibilidad funcional ha sido revelada por los trabajos de algunos autores, en el sentido de que las proteínas liberables podrían funcionar como "material trófico" en el espacio extracelular, por ejemplo en la manutención de la integridad de las vainas de mielina (Greenfield y Col. 1983b; Hines y Garwood, 1977; Singer, 1969; Singer y Steinberg, 1972), o en la inducción del crecimiento neurítico durante la ontogenia (Arenander y de Vellis, 1980 y 1981 a,b).

3. Conducta y plasticidad. También se ha reportado que la liberación de ciertas proteínas pudiera guardar relación a la presentación de estados conductuales específicos en el animal (Drucker-Colín y Col. - 1975; Drucker-Colín y Spanis, 1975; Drucker-Colín y Gutierrez, 1976) y en la adquisición y manutención de respuestas plásticas a estímulos específicos (ejem. potenciación a largo plazo) (Duffy y Col. 1981).

Por todo lo anteriormente expuesto, podemos concluir que, sin lugar a dudas, el aislamiento, la identificación y caracterización química y funcional de las proteínas liberadas es un paso obligado a seguir en nuestra línea de investigación. En este contexto, las técnicas cromatográficas (ejem. HPLC) y electroforéticas (ejem. en dos dimensiones), como herramientas de alta resolución para separar mezclas complejas de proteínas, serán de indiscutible utilidad. Una vez logrado esto, estaremos en posibilidad de implementar técnicas inmunológicas de gran especificidad y sensibilidad (ejem. con anticuerpos monoclonales) que permitirán la detección e identificación de componentes del material protéico en el perfusado y en el tejido. Estos avances nos conducirán al estudio de los mecanismos a través de los cuales se liberan, y el correlato de este fenómeno con la liberación de las distintas sustancias con función transmisora conocidas. Con dicho cuerpo de información, iniciaremos finalmente el estudio de las aún desconocidas funciones y el significado fisiológico de las proteínas liberables en el sistema nervioso.

LIBERACION DE ENCEFALINA DURANTE LA PERFUSION IN VIVO  
DEL GLOBUS PALLIDUS DE LA RATA. RELACIONES CON LOS  
SISTEMAS LIBERADORES GABAERGICOS Y RITMOS DIURNOS.

Entra de las líneas de experimentación a la que se abocó el presente trabajo de tesis se basó en el estudio y la comparación de las posibles variaciones diurnas de la liberación in vivo de encefalinas y GABA en la región del pallidum de la rata en libertad de movimiento.

Tres hechos justificaron la implementación de este estudio: a) La región es un modelo neural de estudio idóneo de la liberación de los dos transmisores, ya que exhibe uno de los más altos contenidos cerebrales de GABA y encefalina localizados en terminales nerviosas; b) La existencia de evidencias experimentales que sugieren interrelaciones funcionales recíprocas entre los sistemas GABAérgicos y encefalinérgicos a este nivel; c) La existencia de ritmos circádicos y cambios periódicos en la producción o reconocimiento de opioides endógenos por diversos sistemas biológicos.

Nuestros resultados indican que la encefalina y el GABA siguen patrones circádicos diurnos de liberación en condiciones de reposo y estimulación despolarizante (ver en citas: II, Fig. 6; III, Fig. 1, 2, 3, y Tabla I) correlativamente inversos. A priori, dos probables factores causales se consideraron para explicar e interpretar estos resultados:

a) Artificio metodológico. Ya que Cesselin y colaboradores (1981) habían reportado que el contenido y la liberación de encefalina del globus pallidus de la rata era significativamente mayor en la porción ventral que en la caudal, existía la posibilidad de que nuestros altos niveles de liberación de encefalina, hacia altas horas del día, fueran el reflejo de una implantación sistemática de la cánula de perfusión en las regiones ventrales del pallidum. Nuestro análisis histológico de la localización de la cánula excluye esta posibilidad, ya que no hubo correlación entre la localización del trayecto de ésta y la magnitud de la liberación de encefalina o GABA (dato no mostrado en las publicaciones). Por otro lado, también se consideró la posibilidad de que las diferencias de la liberación de GABA-H<sup>3</sup> entre la mañana y tarde estuvieran condicionadas a diferentes niveles de captación del transmisor en esos horarios. Nuestros resultados también descartan esta opción, ya que nos mostraron una diferencia en la captación de GABA-H<sup>3</sup> (55 ± 5% y 61 ± 4% del total de la radiactividad inyectada en el tejido, respectivamente) y la fracción de trazador

radioactivo asociado a GABA-H<sup>3</sup> en los perfusados (en condiciones de reposo, a las tres horas de perfusión el 60% de la marca era GABA, proporción que se ve reducida al 30% después de las 6 horas) entre las sesiones de la mañana y tarde. No obstante esto, las diferencias rítmicas diurnas observadas en la liberación de encefalina en el globus pallidus también podían ser debidas a cambios en el contenido encefalinérgico en el caudado (donde se sintetizan) o en el pallidum donde se almacenan y liberan). En este sentido, Wesche y Frederickson (1981) habían reportado un incremento específico del contenido palidal de encefalina entre las 7:30 am - 3:30 pm en ratones bajo estado de estrés. Nuestros resultados sobre la medición del contenido palidal de encefalina en nuestro modelo animal de estudio, excluyen esta posibilidad, ya que no hubo diferencias significativas en los valores estimados en diferentes horas del día ( $5 \pm 1 \times 10^3$  unidades para el globus pallidus y  $2 \pm 0.2 \times 10^3$  unidades para el núcleo caudado a las 8:00 am, 2:00 pm y 10:00 pm, indistintamente).

). En vista de que el factor artificial no parece causar la forma de liberación rítmica diurna de encefalina y GABA en el pallidum de la rata, y en vista de que sigue patrones opuestos, es probable que este fenómeno represente un evento fisiológico real en esta estructura, debido probablemente a la existencia de mecanismos de control recíprocos entre los sistemas neuronales que manejan a estas sustancias como transmisores. Desde un punto de vista morfológico, no disponemos de suficientes evidencias estructurales que permitan establecer la interrelación directa entre los dos sistemas transmisores mediante la formación de algún tipo de contacto sináptico a nivel estriatal (Dertel y Mugnaini, 1984). A pesar de esto, los resultados de estudios farmacológicos con preparaciones in vitro e in vivo sugieren la existencia de relaciones funcionales recíprocas complejas entre la transmisión GABAérgica y encefalinérgica estriatal. Por una lado, pocas es la información experimental de la que se dispone acerca de la influencia de los sistemas neuronales que manejan péptidos opioides sobre la función GABAérgica a nivel estriatal. Moroni y colaboradores

(1978, 1979) han demostrado la existencia de un incremento en la tasa de recambio de GABA en el pallidum después de la administración de opiáceos en el caudado. Este efecto parece ser debido a una inhibición mediada por estas sustancias sobre las neuronas GABAérgicas estriatales, lo cual daría la pauta a la activación de las neuronas GABAérgicas de la vía caudado-palidal. Van der Heyden y colaboradores (1980c) han demostrado una disminución de la liberación "espontánea" in vivo del GABA endógeno en el estriado de la rata por la administración local de morfina. El efecto parece ser mediado a través de sitios de reconocimiento específicos para los opioides localizados en las neuronas GABAérgicas de esta estructura, ya que la administración simultánea del antagonista opioide naltrexona lo evita. En cuanto a la influencia de los sistemas GABAérgicos sobre la función encefalinérgica estriatal, la información experimental orienta a pensar en la existencia de mecanismos de control inhibitorios sobre la liberación de encefalina (Bayón y Col. 1981c; Burgoin y Col. 1982; Herz y Col. 1980). Ya que a nivel palidal se ha demostrado que las encefalinas se encuentran localizadas casi exclusivamente en las terminales nerviosas de la vía encefalinérgica caudado-palidal, Bayón y colaboradores (1981c) y Burgoin y colaboradores (1982) proponen que estos efectos pueden ser mediados a nivel presináptico, a través de sitios de reconocimiento específicos para GABA.

Por otro lado, las interacciones observadas entre los opiáceos y GABA a nivel conductual parecen ser relevantes dentro del contexto de la interpretación de nuestros resultados: la administración sistémica de drogas que promueven la transmisión GABAérgica reducen la actividad locomotora de la rata, efecto que es potenciado por el antagonista opioide naloxona; la administración de naloxona sola, da origen a una reducción en la locomoción, efecto que es bloqueado por antagonistas del receptor de GABA (Agmo y Tarasco, 1985). También existen reportes que han documentado los efectos de la aplicación de encefalinas y GABA en el globus pallidus, los cuales muestran que estos transmisores producen acciones opuestas sobre la actividad motora de la rata, consistentes con aquellas observadas después de su administración

istémica: la inyección bilateral de análogos de encefalinas en el -  
pallidum da origen a hiperactividad motriz, la cual es bloqueada por  
aloxona (Joyce y Col. 1981). En contraste, la administración bilate-  
al en el pallidum de drogas que promueven la transmisión GABAérgica  
roducen acinesia y catalepsia, mientras que el efecto opuesto es -  
bservado con la administración de drogas que antagonizan las acciones  
e este transmisor (Pycock y Col. 1976; Scheel-Krüger y Col. 1981).  
asados en tal cuerpo de información, es factible proponer que un au-  
ento en la liberación de encefalina y una disminución en la del GABA  
n las horas de la noche en el pallidum podría dar origen a hiperac-  
ividad. Ya que el pallidum es una estructura cerebral que participa  
n los sistemas neurales de control y programación de la conducta -  
otora de mamíferos (García-Rill, 1986), y ya que la rata es un ani-  
al que exhibe hábitos predominantemente nocturnos de actividad, -  
geríamos que la transmisión encefalina-GABA en esta estructura puede  
representar un eslabón importante en el control de sus ritmos diurnos  
e actividad motora.

V I

B I B L I O G R A F I A

NOTA: " LA BIBLIOGRAFIA DE LAS SECCIONES DE PROCEDIMIENTOS  
EXPERIMENTALES Y RESULTADOS SE ENCUENTRA AL FINAL  
DE LAS PUBLICACIONES QUE SE INCLUYEN COMO PARTE DE  
LA TESIS."

- Abdul-Ghani, A.S., Bradford, H.F., Cox, D.W.G., and Dodd, P.R. (1979). Peripheral sensory stimulation and the release of transmitter amino acids in vivo from specific regions of cerebral cortex. *Brain Res.* 171: 55-56.
- Abdul-Ghani, A.S., Coutinho-Netto, J., and Bradford, H.F. (1980). The action of  $\gamma$ -vinyl-GABA and  $\gamma$ -acetylenic-GABA on the resting and stimulated release of GABA in vivo. *Brain Res.* 191: 471-478.
- Abraham, D., Pisano, J.J., Udenfriend, S.J. (1964). Uptake of carnosine and homocarnosine by rat brain slices. *Arch. Biochem. Biophys.* 104: 160-165.
- Adams, P.R., and Brown, D.A. (1979). Electrical responses of presumed sympathetic cells to  $K^+$  ions and to preganglionic nerve stimulation. *J. Physiol. (London)* 293:95-101.
- Agmo, A., and Tarasco, C. (1985). Interactions between naloxone and GABA in the control of locomotion activity in the rat. *J. Neural. Transm.* 61: 137-149.
- Akil, H., Richardson, D.E., Hughes, J., and Barchas, J.D. (1978). Enkephalin-like material elevated in ventricular cerebrospinal fluid of pain patients after analgetic focal stimulation. *Science* 204:463-465.
- Akil, H., Watson, S.J., Young, E., Lewis, M.E., Kachaturian, H., and Walker, J.M. (1984). Endogenous opioids: Biology and Function. In: Annual review of Neuroscience ( W.M. Cowan , E.M. Shooter, Ch. F. Stevens, and R.F. Thompson, eds.) Annual Review INC. California, USA. Vol. 7, pp. 223-255.
- Almenof, J.S., Wilk, T., and Orlowski, M. (1981). Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 206-214.
- Andersen, R.K., Lund, J.P. and Puil, E. (1978). Enkephalin and substance P effects related to trigeminal pain. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56: 216-222.
- Appeltauer, G.S.L., and Korr, I.M. (1975). Axonal delivery of soluble, insoluble and electrophoretic fractions of neuronal proteins to muscle. *Exp. Neurol.* 46: 132-146.
- Appeltauer, G.S.L., and Korr, I.M. (1977). Further electrophoretic studies on proteins of neuronal origins in skeletal muscle. *Exp. Neurol.* 57: 713-724.
- Arbilla, S., and Langer, S.Z. (1979). Facilitation by GABA of the potassium-evoked release of  $^3H$ -noradrenaline from the rat occipital cortex. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 306; 161.
- Arenander, A.T., and De Vellis, J. (1980). Glial-released proteins in cloned cultures and their modulation by hydrocortisone. *Brain Res.* 200: 401-419.



- Arenander, A.T., and De Vellis, J. (1981a). Glial-released proteins: two-dimensional electrophoretic identification of proteins regulated by hydrocortisone. *Brain Res.* 224: 105-116.
- Arenander, A.T., and De Vellis, J. (1981b). Glial-released proteins: influences on neuronal morphological differentiation. *Brain Res.* 224: 117-127.
- Aronin, N., Difiglia, M., Graveland, G., Schwartz, W., and Wu, J-Y. (1984). Localization of immunoreactive enkephalins in GABA synthesizing neurons of the rat neostriatum. *Brain Res.* 300: 376-380.
- Awapara, J., Landua, A.J., Fuerst, R., and Seale, B. (1950). Free  $\gamma$ -amino butyric acid in brain. *J. Biol. Chem.* 187:35-39.
- Bainton, D.F. (1981). The discovery of lysosomes. *J. Cell. Biol.* 91 (pt.2): 66a-77a.
- Balcom, C.J., Lennox, R.H., and Meyerhoff, J.L. (1975). Regional  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in rat brain determined by microwave fixation. *J. Neurochem.* 24:609.
- Banks, P., and Helle, K. (1965). The release of protein from stimulated adrenal medulla. *Biochem. J.* 97: 40c.
- Barber, R., Vaughn, J.E., Saito, K., McLaughlin, B.J., and Roberts, E. (1978). GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Brain Res.* 141: 35-55.
- Bareggi, S.R., and Giacobini, E. (1978). Acetylcholinesterase activity in ventricular and cisternal CFS of dogs: effects of chlorpromazine. *J. Neurosci. Res.* 31: 335-339.
- Bayón, A., Rossier, J., Mauss, A., Bloom, F.E., Iversen, L.L., Ling, N., and Guillemin, R. (1978). In vitro release of Methionine-enkephalin and Leucine-enkephalin from the rat globus pallidus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3503-3506.
- Bayón, A., Koda, L., Battenberg, E., and Bloom, F.E. (1980). Redistribution of endorphin and enkephalin immunoreactivity in the rat brain and pituitary after in vivo treatment with colchicine or cytochalasin B. *Brain Res.* 183: 103-111.
- Bayón, A., Drucker-Colín, R., Lugo, L., Shoemaker, W.J., Azad, R., and Bloom, F.E. (1981a). Enkephalin release from the globus pallidus: in vitro and in vivo studies. In: *Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission* ( R. Tapia and W. Cowan, eds.) Plenum Press, New York, pp. 29-41.

Bayón,A., Shoemaker,W.J.,Lugo,L., Azad,R., Ling,N., Drucker-Colín,R., and Bloom,F.E. (1981b). In vivo release of enkephalin from the globus pallidus. *Neurosci. Lett.* 24: 65-70.

Bayón,A., Drucker-Colín,R., Lugo,L., Shoemaker,W.J., Azad,R., and Bloom, F.E. (1981c). In vivo release of enkephalin from the globus pallidus is tonically inhibited by endogenous GABA. *Soc. Neurosci. Abstr.* 7: 800.

Bayón,A., Shoemaker,W.J., McGinty,J.F., and Bloom,F.E.(1983). Immuno detection of endorphins and enkephalins: a search for reliability. In: *Internat. Rev. of Neurobiol.* 24: 51-92.

Bayón,A., and Drucker-Colín,R.R. (1985). Methodological alternatives and experimental strategies for studying the in vivo perfusion and release of neuroactive substances in the central nervous system. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances; Methods and Strategies* ( A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.), Academic Press, pp. 1-7.

Bayón,A. (1987). In vivo and in vitro studies on peptide release. In: *Neuromethods peptides* (Q.J. Pittman, G.B. Baker and A.A. Boulton, eds.) ,Humana Press, New Jersey,

Beleslin,D.B., Polak,R.L., and Sproull,D.H.(1985). The release of acetylcholine into the cerebral subarachnoid space of anesthetized cats. *J. Physiol.* 177: 420-428.

Beleslin,D.B., and Myers,R.( 1970). A techniques for repeated superfusion or withdrawal of fluid from the exposed cerebral cortex of a conscious animal. *Physiol. Behav.* 5: 1173-1175.

Benowitz,L.I., and Shashoua,V.E.(1979). Rapidly labeled and secreted proteins of the chick brain. *J. Neurochem.* 32: 797-809.

Bensadoun,A., and Weinstein,D.(1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Chim.* 70: 241-250.

Benuck,M., and Marks,N. (1980). Characterization of a distinct membrane bound dipeptidyl carboxypeptidase inactivating enkephalin in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 822-828.

Berl,S., Lajtha,A., and Waelsch,H. (1961). Amino acid and protein metabolism. VI. Cerebral compartments of glutamic acid metabolism. *J. Neurochem.* 7: 186-197.

Besson,M.J., Gauchy,C., and Glowinski,J.(1982). Bilateral asymmetrical changes in the nigral release of GABA-H<sup>3</sup> induced by unilateral application of acetylcholine in the cat caudate nucleus. *Brain Res.* 241:241-248.

Besson,M.J., Girault,J.A., Spampinato,U., Glowinski,J., and Savaki, H.E. (1984). Action of dopaminergic agonist on the in vivo neosynthesized <sup>3</sup>H-GABA release in the rat striatum. *Soc. Neurosci. Abstr.* 10 (part 2) : 204-210.

- Besson, M.J., Kemel, M.L., Gauchy, C., Girault, J.A., Spampinato, U., Lantin, N., Desban, M., and Glowinski, J. (1986). In vivo measurement of (<sup>3</sup>H) GABA release: an approach to the study of the regulation of GABA-containing neurons in the basal ganglia and associated structures in the cat and the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 473: 475-489.
- Bhattacharya, B.K., and Feldberg, W. (1958a). Perfusion of cerebral ventricles: assay of pharmacologically active substances in the effluent from the cisterna and aqueduct. *Brit. J. Pharmacol.* 13:163--174.
- Björklund, A., Dunnett, S.B., Stenevi, U., Lewis, M.E., and Iversen, S.D. (1980). Reinnervation of denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res.* 199: 307-333.
- Bloom, F.E., McGinty, J.F. (1981). Endogenous peptides in learning and memory (J. Martinez and J. McGaugh, eds.).
- Blumberg, S., Vogel, Z., and Alstein, M. (1981). Inhibition of enkephalin degrading enzymes from rat brain, and of thermolysis by amino acid hydroxamate. *Life Sci.* 28: 301-306.
- Boarder, M.R., Lockfield, A.J., and Barchas, J.D. (1982). Met-enkephalin (Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>) immunoreactivity in bovine caudate and bovine adrenal medulla. *J. Neurochem.* 39: 149-154.
- Bowery, N.G., Jones, G.P., and Neal, M.J. (1976). Selective inhibition of neuronal GABA uptake by cis-1,3-aminocyclohexanecarboxylic acid. *Nature (London)* 264:281-284.
- Bowery, N.G., Doble, A., Hill, D.R., Hudson, A.L., Shaw, J.S., and Turnbull, M.J. (1979 a). Baclofen: a selective agonist for a novel type of GABA receptor. *Br. J. Pharmacol.* 67: 444.
- Bowery, N.G., Brown, D.A., and Marsh, S. (1979b).  $\gamma$ -aminobutyric acid efflux from sympathetic glial cells: effect of "depolarizing" agents. *J. Physiol. (London)* 293: 75-101.
- Bradbury, A.F., Feldberg, W.F., Smyth, D.G., Snell, C. (1976). Lipotropin C-fragment: an endogenous peptide with potent analgesic activity. In: *Opiates and Endogenous Opioid Peptides* (H.W. Kosterlitz, ed.) North Holland, pp. 9-17.
- Bradford, H.F., Ward, H.K., and Thomas, A.J. (1978). Glutamine- A major substrate for nerve endings. *J. Neurochem.* 30: 1453-1459.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brownstein, M.J., Mroz, E.A., Tappaz, M.L., and Leeman, S.E. (1977). On the origin of substance P and glutamic acid decarboxylase (GAD) in the substantia nigra. *Brain Res.* 135: 315-323.

Bunney, B.S., Aghajanian, G.K., and Roth, R.H. (1973). Comparison of effects of L-dopa, amphetamine and apomorphine on firing rate of rat dopaminergic cells. *Nature New Biol.* 24: 123.

Burgoin, S., Cesselin, F., Artaud, F., Glowinski, J., and Hamon, M. (1982). In vivo modulation by GABA-related drugs of Met-enkephalin release in basal ganglia of the cat brain. *Brain Res.* 248: 321-330.

Butcher, L.L., and Woolf, N.J. (1982). Monoaminergic-cholinergic relationship in the chemical communication matrix of the substantia nigra and neostriatum. *Brain Res. Bull.* 9:475.

Čanžek, V., and Reubi, J.C. (1980). The effect of cochlear nerve lesion on the release of glutamate, aspartate and GABA from cat cochlear nucleus in vitro. *Exp. Brain Res.* 38: 437-441.

Carpenter, B.M. (1984). Interconnections between the corpus striatum and brain stem nuclei. In: *The Basal Ganglia; Structure and Function. Advances in Behavioural Biology* (J.S. McKenzie, R.E. Kemm and L.N. Wilcock, eds.) Plenum Press, New York, Vol. 30, pp.1-68.

Carr, L.A., and Moore, K.E. (1969). Norepinephrine: release from brain by d-amphetamine in vivo. *Science* 164: 322-323.

Cattabeni, F., Maggi, A., Monduzzi, M., de Angelis, L., and Racagni, G. (1978). GABA: circadian fluctuations in rat hypothalamus. *J. Neurochem.* 31: 565-567.

Cesselin, F., Montastruc, J.L., Gros, C., Burgoin, S., and Hamon, M. (1980). Met-enkephalin levels and opiate receptors in the spinal cord of chronic suffering rats. *Brain Res.* 191: 289-293.

Cesselin, F., Soubrie, P., Burgoin, S., Artaud, F., Reisine, T.D., Michelot, R., Glowinski, J., and Hamon, M. (1981). In vivo release of Met-enkephalin in the cat brain. *Neuroscience* 6: 301-313.

Cesselin, F., Oliveras, J.L., Burgoin, S., Sierralta, F., Michelot, R., Besson, J.M., and Hamon, M. (1982). Increased levels of met-enkephalin-like material in the CSF of anaesthetized cats after tooth pulp stimulation. *Brain Res.* 237: 325-338.

Chan-Palay, V., Ito, M., Tongroach, P., Sakarao, M., Palay, S. (1982). Inhibitory effects of motilin, somatostatin, (Leu)enkephalin, (Met)enkephalin, and taurine on neurons of the lateral vestibular nucleus; interactions with  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3355-3359.

Charli, J.L., Ponce, G., McKelvy, J.F., Joseph-Bravo, P. (1984). Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices. *J. Neurochem.* 42: 981-986.

Chesselet, M.F. (1984). Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: facts and hypothesis. *Neuroscience* 12: 347-375.

Chéramy, A., Romo, R., and Glowinski, J. (1985). Dopamine release and neuronal activity in the two nigrostriatal systems. In : In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.), Academic Press, Orlando, pp. 161-175.

Chin, C.A., and Lâm, D.M.K. (1982). The effects of morphine, enkephalins and other related reagents on the release of (<sup>3</sup>H)GABA from tealeost retina. Invest. Ophthalmol. (suppl.) 22: 247.

Chretiën, M., Benjamet, S., Dragon, N., Sedah, N.G., Lis, M. (1976). Isolation of peptides with opiate activity from sheep and human pituitaries: relationship to  $\beta$ -LPH. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72:472-478.

Chubb, I.W., and Smith, A.D. (1974a). Release of an isoenzyme of acetylcholinesterase from the perfused adrenal gland. J. Physiol. (London) 239: 97-98.

Chubb, I.W., and Smith, A.D. (1974b). Increase concentration of an isoenzyme of acetylcholinesterase in rabbit cerebrospinal fluid after peripheral stimulation. J. Physiol. (London) 242: 118-120

Chubb, I.W., and Smith, A.D. (1975a). Isoenzyme of soluble and membrane-bound acetylcholinesterase in bovine splanchnic nerve and adrenal medulla. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 191: 245-261.

Chubb, I.W., and Smith, A.D. (1975b). Release of acetylcholinesterase into the perfusate from the ox adrenal gland. Proc. R. B. 191:263.

Chubb, I.W., Goodman, S., and Smith, A.D. (1976). Is acetylcholinesterase secreted from central neurons into the cerebrospinal fluid? Neuroscience 1: 57-62.

Chubb, I.W., Hodgson, A.J., and White, G.H. (1980). Acetylcholinesterase hydrolyses substance P. Neuroscience 5: 2065-2072.

Chubb, I.W., Greenfield, S.A., and Hodgson, A.J. (1983). Is acetylcholinesterase the biggest "neuropeptide" of them all? Neurosci. Lett. (suppl.) 11:56.

Chou, S.C., and Goldstein, A. (1960). Chromogenic groupings in the Lowry protein determinations. Biochem. J. 75: 109-115.

Clark, R.M., and Collins, G.G.S. (1976). The release of endogenous amino acids from the rat visual cortex. J. Physiol. (Lond.) 262:383-400.

Cohn, D.V., Morrisey, J.J., Hamilton, J.W., Shofstall, R.E., Smardo, F.L., and Chu, L.L.H. (1981). Isolation and partial characterization of secretory protein I from bovine parathyroid glands. Biochemistry 20: 4135-4140.

Cohn,D.V., and Elting,J.(1983).Biosynthesis, processing, and secretion of parathormone and secretory protein I. Recent Prog. Hormone Res. 39: 181-209.

Cohn,D.V., Elting,J.J., Frick,M., Elde,R.(1984). Selective localization of the parathyroid secretory protein I/adrenal medulla chromogranin A protein family in a wide variety of endocrine cells of the rat. Endocrinology 114: 1963-1973.

Collins,G.G.S.(1977). The release of endogenous amino acids from rat visual cortex by calcium ions in the presence of the calcium ionophores X537A and A23187. J.. Neurochem. 28: 461-463.

Comb,M., Herbert,E., Crea,R.(1982a). Partial characterization of the mRNA that codes for enkephalins in bovine adrenal medulla and human pheochromocytoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 360-364.

Comb,M., Seeberg,P.H., Adelman,J., Eiden,L., and Herbert,E.(1982b). Primary structure of human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. Nature 295: 663-666.

Cubeddu,L.X., Barnes,E.M., Langer,S.Z., and Weiner,N.(1974). Release of norepinephrine and dopamine  $\beta$ -hydroxylase by nerve stimulation.I. Role of neuronal and extraneuronal uptake and of alpha presynaptic receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 190: 431-450.

Cuello,A.C., and Paxinos,G.(1978). Evidence for a long Leu-enkephalin striopallidal pathway in rat brain. Nature 271: 178-180.

Cuello,A.C., Romero,E., and Smith,A.D.( 1981). In vitro release of acetylcholinesterase from the rat substantia nigra. J.Physiol. 312: 14-15.

Curtis,D.R., and Johnston,G.A.R.(1974). Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. Ergeb. Physiol. 69: 97.

Curtis ,D.R.(1975). Gama-aminobutyric and glutamic acids as mammalian central transmitters. In: Metabolic Compartmentation and neurotransmission (S.Berl, D.Clarke and D.Schneider, eds.) Plenum Press, New York, pp. 11-36.

Da Silva,F.H., and Sproull,D.H.(1964). Systemic absorption of adrenaline from the cerebral fluid spaces of the cat. J. Physiol. 171:494-503.

Davson,H.(1970). Physiology of the cerebrospinal fluid (H.Davson,ed.) J.A. Churchill, London.

De Feudis,F.V., Delgado,J.M.R., and Roth,R.H.(1970). Content, synthesis and collectability of amino acids in various structures of brain of Rhesus Monkeys. Brain Res. 18: 15.

Del Fiacco,M., Paxinos,G., and Cuello,A.C.(1982). Neostriatal enkephalin-immunoreactive project the globus pallidus. Brain Res.231: 1-17.

Delgado, J.M.R. (1970). Telecommunication in brain research. In: "Telemetric methods in pharmacology" (Proc. 4th Congr. Pharmacol.), pp. 270-278, Basel, Schwabe and Co.

Delgado, J.M.R., Lerma, J., Martin del Rio, R., and Solís, J.M. (1985). Use of dalytrodes in brain neurochemistry. In: In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances; Methods and Strategies (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.), Academic Press, Orlando, Fla. pp. 95-117.

De la Baume, S., Schwartz, J., Chaillet, P., Marcais-Collado, H., and Constantin, J. (1983). Participation of both "enkephalinase" and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. Neuroscience 8: 143-151.

De Lorenzo, R.J. (1982). Calmodulin modulation of the calcium signal in synaptic transmission. In: Neurotransmitter interaction and compartmentation (H.F. Buford, ed.), Plenum Press, New York, pp. 101-120.

De Potter, W.P., Moerman, E.J., De Schaepdryver, A.F., and Smith, A.D. (1969a). Release of noradrenaline and dopamine- $\beta$ -hydroxylase upon splenic nerve stimulation. Proc. 4th Int. Congr. Pharmacol. Abstr. p146, Basel, Schwabe and Co.

De Potter, W.P., De Schaepdryver, A.F., Moerman, E.J., and Smith, A.D. (1969b). Evidence for the release of vesicle proteins together with noradrenaline upon stimulation of splenic nerve. J. Physiol. 204: 102-104.

De Potter, W.P., Pham-Hwu Chau, C., De Smet, F., and De Schaepdryver, A.F. (1976). The presence of dopamine- $\beta$ -hydroxylase in the cerebrospinal fluid of rabbits and its increased concentration after stimulation of peripheral nerves and cold stress. Neuroscience 1: 523-529.

Diem, K., and Lentner, C. (1970). Scientific Tables, GEIGY Pharmaceuticals, Ardsley, N.Y. pp. 638.

Dietl, H., and Philuppu, A. (1979). In vivo release of endogenous GABA in the cat hypothalamus. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308: 143-147.

Dingledine, R., and Goldstein, A. (1976). Effect of synaptic transmission blockade on morphine action in the guinea-pig myenteric plexus. J. Pharmacol. Exp. Ther. 196: 97-106.

Djamgoz, M.B.A., Stell, W.K., Chin, C.A., and Lamm, D.M. (1981). An opiate system in the goldfish retina. Nature 292: 620-623.

Donato, R., Michetti, F., and Miani, N. (1975). Soluble and membrane-bound S-100 protein in cerebral cortex synaptosomes. Properties of the S-100 receptor. Brain Res. 98: 561-573.

- Dray, A. (1979). The striatum and the substantia nigra: a commentary on their relationships. *Neuroscience* 4: 1407.
- Drouin, J., Goldman, H.M. (1980). Most of the coding region of rat ACTH beta-LPH precursor gene lacks intervening sequences. *Nature* 288:610-613.
- Drucker-Colín, R.R., and Spanis, C.W. (1975). Neurohumoral correlates of sleep; increase of proteins during rapid eye movement sleep. *Separatum Experientia* 31: 551-552.
- Drucker-Colín, R.R., Spanis, C.W., and Mcgaugh, J.L. (1975). Changes in protein levels in perfusates of freely moving cats: relation to behavioural state. *Science* 187: 963-965.
- Drucker-Colín, R.R., and Gutierrez, M.C. (1976). Effects of forebrain lesions on release of proteins from the midbrain reticular formation during the sleep-wake cycle. *Exp. Neurol.* 52: 339-344.
- Drucker-Colín, R.R. (1981). Neuroproteins excitability and REM sleep. In: *Sleep, Dreams and Memory*. Spectrum Publications, pp.73-94.
- Duffy, C., Teyler, T.J., and Shashoua, V.E. (1981). Long term potentiation in the hippocampal slice: evidence for stimulated secretion of newly synthesized proteins. *Science* 212: 1184-1151.
- Duggan, A.W., Hall, J.C., and Headley, P.M. (1977). Enkephalins and dorsal horn neurones of the cat: effects on responses to noxious and innocuous skin stimuli. *Br. J. Pharmacol.* 61: 399-408.
- Duka, T., Wüster, M., and Herz, A. (1979). Rapid changes in enkephalin levels in rat striatum and hypothalamus induced by diazepam. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 309: 1-5.
- Duka, T., Wüster, M., and Herz, A. (1980). Benzodiazepines modulate striatal enkephalin levels via a GABAergic mechanism. *Life Sci.* 26:771.
- Eipper, B., and Mains, R. (1978). Existence of a common precursor to ACTH and endorphin in the anterior and intermediate lobes of the rat pituitary. *J. Supramol. Struct.* 8: 247-262.
- Elde, R., Hökfelt, T., Johansson, O., and Terenius, L. (1976). Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing substance-P containing primary afferents neurons in the rat. *Neuroscience* 1: 131;-136.
- Emson, P.C. (1979). Peptides as a neurotransmitter candidates in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.* 13:61.
- Engel, G.E., and Foster, A.C. (1983). Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 10: 701-719.



- Fahn, S., and Côté, L.J. (1968). Regional distribution of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in brain of the rhesus monkey. *J. Neurochem.* 15: 209.
- Fahn, S. (1976). Regional distribution studies of GABA and other putative neurotransmitters and their enzymes. In: "GABA in Nervous System Function" (E. Roberts, ed.), Raven Press, New York.
- Feldberg, W., and Myers, R.D. (1966). Hypothermia produced by chloralose acting on the hypothalamus. *J. Physiol.* 179: 509-517.
- Feltz, P. (1971). Gamma-aminobutyric acid and a caudate-nigral inhibition. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* 48: 1113-1115.
- Fernandez, H.L., and Inestrosa, N.C. (1976). Role of axoplasmic transport in neurotrophic regulation of muscle end plate acetylcholinesterase. *Nature* 262: 55.
- Fields, H.L., Emson, P.C., Leigh, D.K., Gilbert, R., and Iversen, L.L. (1980). Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. *Nature* 284: 351.
- Finley, J.C.W., Maderut, J.L., and Petrusz, P. (1981). The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 198: 541-565.
- Fischli, W., Goldstein, A., Hunkapiller, M.W., Hodd, L.E. (1982). Two "big" dynorphins from porcine pituitary. *Life Sci.* 31: 1769-1772.
- Fonnum, F., Grofová, I., Rinvik, E., Storm-Mathisen, J., and Walberg, F. (1974). Origin and distribution of glutamate decarboxylase in substantia nigra of the cat. *Brain Res.* 71: 77-92.
- Fonnum, F., Grofová, I., and Rinvik, E. (1978). Origin and distribution of glutamate decarboxylase in the nucleus subthalamus of the cat. *Brain Res.* 153: 370.
- Fonnum, F., Gottesfeld, Z., and Grofová, I. (1978). Distribution of glutamate decarboxylase, choline acetyltransferase and aromatic amino acid decarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidence for striopallidal, striatoentopeduncular and striatonigral ABAergic fibres. *Brain Res.* 143: 125-138.
- Fox, R., and Hilton, S. (1958). Bradykinin formation in human skin as a factor in heat vasodilatation. *J. Physiol.* 142: 219-232.
- Fricker, L.D., and Snyder, S. (1983). Purification and characterization of enkephalin-convertase, an enkephalin-synthesizing carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 258: 10950-10955.
- Friedel, T., Orchard, I., and Loughton, B.G. (1981). Release of neurosecretory protein from insect neurohemal tissue following electrical stimulation. *Brain Res.* 208: 451-455.
- Fuenmayor, L., Smith, A.D., and Vogt, M. (1976). Acetylcholinesterase in perfusates of the cats cerebral ventricles. *J. Physiol.* 263: 165-166.

Fukata, J., Nakai, Y., and Imura, H. (1980). Release of immunoreactive  $\beta$ -endorphin from rat hypothalamic fragments in vitro. Brain Res. 201: 492-496.

Fulcher, I.S., Matsas, R., Turner, A.J., and Kenny, A.J. (1982). Kidney neutral endopeptidase and the hydrolysis of enkephalin by synaptic membranes show similar sensitivity to inhibitor. Biochem. J. 203: 519-522.

Gaddum, J.H. (1961). Push-pull cannulae. J. Physiol. 155:1-2.

Gafford, J., Skidgel, R.A., Erdos, E., and Hersh, L.B. (1983). Human kidney "enkephalinase". a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. Biochemistry 22: 3265-3271.

Garcia-Rill, E. (1986). The basal ganglia and the locomotor regions. Brain. Res. Rev. 11: 47-63.

Gauchy, C.M., Iversen, L.L., and Jessel, T.M. (1977). The spontaneous and evoked release of newly synthesized ( $^{14}\text{C}$ ) GABA from rat cerebral cortex in vitro. Brain Res. 138: 374-379.

Gauchy, C., Kemel, M.L., Glowinski, J., and Besson, M.J. (1980). In vivo release of endogenously synthesized ( $^3\text{H}$ ) GABA from the cat substantia nigra and the pallido-entopeduncular nuclei. Brain Res. 192:129-141.

Geffen, L., Livett, B.G., and Rush, L. (1970). Immunohistochemical localization of chromogranins in sheep sympathetic neurons and their release by nerve impulses. In: New Aspects of Storage and Release Mechanisms of Catecholamines (H.G. Kronenberg and H.J. Schuman, eds.), Springer Verlag, New York, pp. 58-72.

George, S.R., and Van Loon, G.R. (1981). Met-enkephalin uptake by a synaptosome-enriched fraction of rat striatum. Neurosci. Lett. 26:297-300.

Gewirtz, S.R., and Kopin, I.J. (1970). Release of dopamine- $\beta$ -hydroxylase with norepinephrine during cat splenic nerve stimulation. Nature 227: 406-407.

Glowinski, J., and Iversen, L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in rat brain. J. Neurochem. 13: 655-669.

Goldstein, D.J., and Cubeddu, L.X. (1976). Dopamine- $\beta$ -hydroxylase in human cerebrospinal fluid. J. Neurochem. 26: 193-195.

Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., and Hood, L. (1979). Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6666-6670.

Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., and Hood, L. (1981). Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7219-7223.

- Gottesfeld, Z., and Jacowitz, D.M. (1978). Neurochemical and anatomical studies of GABAergic neurons. In: "interactions between putative neurotransmitters in the brain" (S. Garattini, Pujol, and R. Samanin, eds.) Raven Press, New York, pp. 109-126.
- Greenfield, S.A., Chubb, I.W., and Smith, A.D. (1978). The effect of chlorpromazine on the concentration of acetylcholinesterase in the cerebrospinal fluid of rabbits. *Neuropharmacol.* 18: 127-132.
- Greenfield, S.A., and Smith, A.D. (1978). Changes in acetylcholinesterase concentration in rabbit cerebrospinal fluid following central electrical stimulation. *J. Physiol.* 258: 108.
- Greenfield, S.A., and Smith, A.D. (1979). The influence of electrical stimulation of certain brain regions on the concentration of acetylcholinesterase in rabbit cerebrospinal fluid. *Brain Res.* 177: 445-459.
- Greenfield, S.A., Chéramy, A., Leviel, V., and Glowinski, J. (1980). In vivo release of acetylcholinesterase in the cat substantia nigra and caudate nuclei. *Nature* 284: 355.
- Greenfield, S.A., Stein, J.F., Hodgson, A.J., and Chubb, I.W. (1981). Depression of nigral pars compacta cell discharge by exogenous acetylcholinesterase. *Neuroscience* 6: 2287-2295.
- Greenfield, S.A., and Shaw, S.G. (1982). Release of acetylcholinesterase and aminopeptidase in vivo following infusion of amphetamine into the substantia nigra. *Neuroscience* 7: 2883-2893.
- Greenfield, S.A., Chéramy, A., and Glowinski, J. (1983a). Evoked release of proteins from central neurons in vivo. *J. Neurochem.* 40: 1048-1057.
- Greenfield, S.A., Grunewald, R.A., Foley, P., and Shaw, S.G. (1983b). Origin of various enzymes released from the substantia nigra and caudate nucleus: effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigro-striatal pathway. *J. Comp. Neurol.* 214: 87.
- Greenfield, S.A. (1984a). Enzymes as a nigrostriatal neuromodulators. In: *The Basal Ganglia. Adv. Behav. Biol.* (J.S. McKenzie., R.E. Kemm and L.N. Wilcock, eds.), Plenum Press, New York, Vol. 27, pp. 319-322.
- Greenfield, S.A., Chubb, I.W., Grunewald, R.A., Henderson, Z., May, J., Portney, S., Weston, J., and Wright, H.C. (1984b). A non-cholinergic function for acetylcholinesterase in the substantia nigra: behavioural evidence. *Exp. Br. Res.* 54: 513-520.
- Grossman, A., and Rees, L.H. (1983). The neuroendocrinology of opioid peptides. *Br. Med. Bull.* 39: 83-88.
- Gubler, U., Kilpatrick, D.L., Seeberg, P.H., Cage, L.P., Udenfriend, S. (1981). Detection and partial characterization of proenkephalin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5484-5487.

- Gubler, U., Seeberg, P., Hoffman, B.F., Gage, L.P., and Udenfriend, S. (1982). Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* 295: 206-209.
- Gudelsky, G.A., and Porter, J.C. (1979). Morphine -and opioid peptide-induced inhibition of the release of dopamine from tuberoinfundibular neurons. *Life Sci.* 25: 1697-1702.
- Guerrero-Munoz, F., Cerreta, K.V., Guerrero, M.L., and Way, E.L. (1979a). Effect of morphine on synaptosomal  $Ca^{++}$  uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 209: 132-136.
- Guerrero-Munoz, F., Guerrero, M.L., and Way, E.L. (1979b). Effect of morphine on calcium uptake by lysed synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211: 370-374.
- Guillemin, R., Ling, N., Burgus, R. (1976). Endorphins, peptides d'origine hypothalamique et neurohypophysaire d'activite morphinomimetique. Isolament et structure moleculaire d'alpha-endorphine. *CR Acad. Sci. Ser. D* 282: 783-785.
- Guth, L., Albers, R.W., and Brown, W.C. (1964). Quantitative changes in cholinesterase activity of denervated muscle fibers and sole plates. *Exp. Neurol.* 10:236.
- Haglid, K.G., Hamberger, A., Hansson, H.A., Heydén, H., Persson, L., and Rönnbäck, L. (1974). S-100 protein in synapses of the central nervous system. *Nature* 251: 532-534.
- Hamberger, A., Berthold, C-H., Jacobson, I., Karlsson, B., Lehmann, A., Nyström, B., and Sandberg, M. (1985). In vivo brain dialysis of extracellular nontransmitter and putative transmitter amino acids. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.), Academic Press, New York, pp. 119-139.
- Harsing, G., Yang, H-Y.T., and Costa, E. (1982). Evidence for a  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) mediation in benzodiazepine inhibition of the release of met-enkephalin elicited by depolarization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220:616-620.
- Hattori, T., McGeer, P.L., Fibiger, H.C., and McGeer, E.G. (1973). On the source of GABA-containing terminals in the substantia nigra. Electron microscopic, autoradiographic and biochemical studies. *Brain Res.* 54 : 103.
- Heydén, H., and McEwen, B. (1966). A glial protein specific for the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55: 354-358.
- Jefti, F., and Lichtensteiger, W. (1978). Subcellular distribution of dopamine in substantia nigra of the rat brain: effects of alphabutyrolactone and destruction of noradrenergic afferents suggest formation of particles from dendrites. *J. Neurochem.* 30: 1217.

- Henderson, G., Hughes, J., and Kosterlitz, H.W. (1978). In vitro release of Leu and Met-enkephalin from the corpus striatum. *Nature* 271: 677-679.
- Henderson, Z., and Greenfield, S.A. (1984). Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in substantia nigra: a comparison between rat and guinea pig. *J. Comp. Neurol.* 230: 278-286.
- Hersh, L.B. (1982). Degradation of the enkephalins: the search for enkephalinase. *Mol. Cell. Biochem.* 47: 35-43.
- Herz, A., Duka, T., Gramsch, C., Höllt, V., Osborne, H., Przewlocki, R., Schultz, R., and Wüster, M. (1980). Pharmacologic manipulation of brain and pituitary endorphin content and release. In: "Neural peptides and neuronal communication" (E. Costa and M. Trabucchi, eds.) Raven Press, New York, pp. 323-333.
- Hesse, G.H., Hofstein, R., and Shashoua, V.E. (1984). Protein release from hippocampus in vitro. *Brain Res.* 305: 61-66.
- Hines, J.F., and Garwood, M.M. (1977). Release of protein from axons during rapid axonal transport: an in vitro preparation. *Brain Res.* 125: 141.
- Hofstein, R., Hesse, G., and Shashoua, V.E. (1983). Proteins of the extracellular fluid of mouse brain: extraction and partial characterization. *J. Neurochem.* 40: 1448-1455.
- Hökfelt, T., Ljungdahl, A., Perez de la Mora, M., and Fuxe, K. (1976). Further evidence that apomorphine increases GABA turnover in the DA cell body rich and DA nerve terminal rich areas of the brain. *Neurosci. Lett.* 2: 239-242.
- Hökfelt, T., Ljungdahl, A., Terenius, L., Elde, R., and Nilsson, G. (1977). Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: enkephalin and substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3081-3085.
- Hökfelt, T., Terenius, L., Kuypers, H.G., and Dann, O. (1979). Evidence for enkephalin immunoreactive neurons in the medulla oblongata projecting to the spinal cord. *Neurosci. Lett.* 14: 55-60.
- Honchar, M.P., Hartman, B.K., and Sharpe, L.G. (1979). Evaluation of in vivo brain site perfusion with the push-pull cannula. *Am. J. Physiol.* 236: R 45-56.
- Hong, J.S., Yang, H-Y.T., Fratta, W., and Costa, E. (1978). Rat striatal methionine-enkephalin content after chronic treatment with cataleptogenic and noncataleptogenic antischizophrenic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205: 141-147.
- Hörsthemke, B., Hamprecht, B., and Bauer, K. (1983). Heterogeneous distribution of enkephalin-degrading peptidases between neuronal and glial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 423-429.

Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A., Morris, H.R. (1985). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579.

Hughes, J., Kosterlitz, H.W., and Smith, T.W. (1977). The distribution of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the brain and peripheral tissues. *Brit. J. Pharmacol.* 61: 639-647.

Hughes, J. (1983). Biogenesis, release and inactivation of enkephalins and dynorphins. *Brit. Med. Bull.* 39: 17-24.

Fujima, T., Nunoki, K. (1985). Superfusion and electrical stimulation of the canine brain with a push-pull cannula. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, Orlando, Fla. pp. 41-49.

Okada, Y., Nakao, K., Yoshima, T., Yanihara, N., Numa, S., and Imura, H. (1982). Existence of Met-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>3</sup>-Leu<sup>5</sup> with Met-enkephalin, leu-enkephalin and Met-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> in the brain of guinea-pig, rat and golden hamster. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 656-662.

Iversen, L.L., and Neal, M.J. (1968). The uptake of <sup>3</sup>H-GABA by slices of rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 15: 1141-1149.

Iversen, L.L., Mitchell, J.F., and Vasante, S. (1971). The release of  $\gamma$ -aminobutyric acid during inhibition in the cat visual cortex. *J. Physiol.* 212: 529-534.

Iversen, L.L. (1972). The uptake, storage, and metabolism of GABA in inhibitory nerves. In: *Perspectives in Neuropharmacology* (S. Snyder, ed.) Oxford University Press, New York, pp. 75-111.

Iversen, L.L., Iversen, S.D., Bloom, F.E., Vargo, T., and Guillemin, R. (1978). Release of enkephalin from rat globus pallidus in vitro. *Nature* 271: 679-681.

Iversen, L.L., Lee, C.M., Gilbert, R.F., Hunt, S., and Emson, F.C. (1980a). Regulation of neuropeptide release. *Proc. R. Soc. Lond.* B210: 91-111.

Iversen, L.L., Iversen, S.D., and Bloom, F.E. (1980b). Opiate receptors influence vasopressin release from nerve terminals in rat neurohypophysis. *Nature* 284: 350-353.

Jackson, R.C., and Blobel, G. (1980). Post-translation processing of full-length presecretory proteins with canine pancreatic signal peptidase. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 343: 391-404.

Lasper, H.H., and Koyama, I. (1969). Rate of release of amino acids from the cerebral cortex in the cat as affected by brainstem and thalamic stimulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 47: 889-905.

Passell, T.M., and Iversen, L.L. (1977). Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature* 268: 549-551.

Jessel, T.M., Emson, P.C., Paxinos, G., and Cuello, A.C. (1978). Topographic projections of substance P and GABA pathways in the striato- and pallido-nigral systems: a biochemical and immunohistochemical study. *Brain Res.* 152: 487-498.

Jessell, T.M., Siegel, R.E., and Fischbach, G.D. (1979). Induction of acetylcholine receptors on cultured skeletal muscle by a factor extracted from brain and spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 5397-5401.

Joyce, E.M., Knoob, G.F., Strecker, R., Iversen, S.D., and Bloom, F.E. (1981). The behavioural effects of enkephalins analogs injected into the ventral tegmental area and globus pallidus. *Brain Res.* 221: 359-370.

Kaczmarek, L.K., and Adey, W.R. (1975). Extracellular release of cerebral macromolecules during potassium and low calcium induced seizures. *Epilepsia* 16: 41-47.

Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S., Numa, S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/Dynorphin precursor. *Nature* 298: 245-249.

Kangawa, K., Minamino, N., Chino, N., Sakakibara, S., Matsuo, H. (1981). The complete amino acid sequence of alpha-neoendorphin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99: 871-878.

Kanner, B.I. (1978). Active transport of  $\gamma$ -aminobutyric acid by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 17: 1207-1211.

Kemper, B., Habner, A., and Potts, J.T. (1974). Parathyroid secretion: discovery of a major calcium-dependent protein. *Science* 184: 167-169.

Kiltpatrick, D.L., Washström, A., Lahm, H.W., Blacker, R., Udenfriend, S. (1982). Rimorphin a unique, naturally occurring (Leu) enkephalin-containing peptide found in association with dynorphin and alpha-neoendorphin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6480-6483.

Kim, J.S., Bak, I.J., Hassler, R., and Okada, Y. (1971). Role of aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system. 2. Some evidence for the existence of a type of GABA-rich strionigral neurons. *Brain Res.* 14: 95-104.

Kimura, S., Lewis, R.V., Stern, A.S., Rossier, J., Stern, S., Udenfriend, S. (1980). Probable precursors of (Leu) and (Met)enkephalin in adrenal medulla: peptides of 3-5 kilodaltons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1681-1685.

Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H., and McGeer, E.G. (1981). The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J. Comp. Neurol.* 200: 157.

- Kishner, N., Sage, J.J., and Smith, W.J. (1967). Mechanism of secretion from the adrenal medulla. II. Release of catecholamines and storage vesicle protein in response to chemical stimulation: *Mol. Pharmacol.* 3: 254-265.
- Kita, T., Inoue, A., Nakanishi, S., Numa, S. (1979). Purification and characterization of the messenger RNA coding for bovine corticotropin/ $\beta$ -Lipotropin precursor. *Eur. J. Biochem.* 93: 213-220.
- Konishi, S., Tsunoo, A., and Otsuka, M. (1980). Enkephalins presynaptically inhibit cholinergic transmission in sympathetic ganglia. *Nature* 282: 515-516.
- Korf, J., Van der Heyden, J.A.M., Venema, K., and Fostema, F. (1981). Distribution and release of GABA in the basal ganglia. In: "GABA and Basal Ganglia" (G. DiChiara and G.L. Gessa, eds.) Raven Press, New York, pp. 105-117.
- Korf, J. (1985). Release of endogenous amino acids, dopamine, and cyclic AMP from the rat brain: methodological aspects and mutual interferences. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 473: 418-433.
- Korr, I.M., Wilkinson, P.N., and Chornock, F.W. (1967). Axonal delivery of neuroplasmic components to muscle cells. *Science* 155: 342-345.
- Korr, I.M., and Appeltauer, G.S.L. (1974). The time-course of axonal transport of neuronal proteins to muscle. *Exp. Neurol.* 43: 452-463.
- Kovacs, D.A., Zoll, J.G., and Erickson, C.K. (1976). Improved intracerebral chemitrode for chemical and electrical studies of the brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4: 621-625.
- Kondo, Y., and Iwatsubo, K.J. (1978). Increased release of preloaded H-GABA from substantia nigra in vivo following stimulation of caudate nucleus and globus pallidus. *Brain Res.* 154: 395-400.
- Creutzberg, G.W., and Toth, L. (1974). Dendritic secretion: a way for neuron to communicate with the vasculature. *Naturwissenschaften* 61:37.
- Krieger, D.T. (1983). Brain peptide: What, where and why?. *Science* 222: 975-985.
- Krnjević, K. (1974). Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.* 54: 418.
- Krnjević, K. (1976). Inhibitory action of GABA and GABA-mimetics on vertebrate neurons. In: *GABA in Nervous System Function* (E. Roberts, T.N. Chase, and D.B. Tower, eds.) Raven Press, New York, pp. 269-281.
- Kumar, M.S.A., Chen, C.L., Sharp, D.C., Liu, J.M., Kalra, P.S., and Kalra, S.P. (1982). Diurnal fluctuations in methionine-enkephalin levels in the hypothalamus and preoptic area of the male rat: Effects of pinealectomy. *Neuroendocrinology* 35: 28-31.



Kuraishi, Y., Sugimoto, M., and Takagi, H. (1981). In: Advances in Endogenous and Exogenous opioids (H. Takagi and E.J. Simon, eds.) Kodansha, Tokyo and Elsevier, New York, pp. 182-184.

Lajtha, A.H. (1983). Enzymes in the nervous system. In: Handbook of Neurochemistry (A. Lajtha, ed.) Plenum Press, New York, Vol. 4:549P.

Lamm, D.M.K., Su, Y.Y.T., and Watt, C.B. (1986). The self-regulating synapse; a functional role for the co-existence of neuroactive substances. Brain Res. Rev. 11: 249-257.

Langer, S.Z. (1977). Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. Br. J. Pharmacol. 60: 481-497.

Le Bars, D., Menetrey, D., and Besson, J.M. (1976). Effects of morphine upon the lamina V type cells activities in the dorsal horn of the decerebrate cat. Brain Res. 113: 293-310.

Lehmann, J., and Fibiger, H.C. (1978). Acetylcholinesterase in substantia nigra and caudate-putamen: properties and localization in dopaminergic neurons. J. Neurochem. 30:615.

Leusen, I. (1948). The influence of calcium, potassium and magnesium ions in cerebrospinal fluid on vasomotor system. J. Physiol. 110:319-329.

Levey, A.I., Wainer, B.H., Mufson, E.J., and Musulam, M-M. (1983). Co-localization of acetylcholinesterase and choline-acetyl-transferase in the rat cerebrum. Neuroscience 9:9.

Leviel, V., Chéramy, A., and Glowinski, J. (1979). Role of dendritic release of dopamine in the reciprocal control of the two nigro-striatal dopaminergic pathways. Nature 280:236.

Levinger, I., and Edery, H. (1971). Removal of acetylcholine during perfusion of liquor-spaces and its influence on outflow volume. Experientia 27: 291-293.

Li, C.H., and Chang, D. (1976). Isolation and structure of a triakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1145-1148.

Licata, A.A., Au, W.Y.M., and Raisz, L. (1972). Secretion of glucosamine-containing macromolecules by rat parathyroid glands in tissue culture. Biochem. Biophys. Acta 261: 143-147.

Liesli, P., Panula, P., and Recharadt, L. (1980). Ultrastructural localization of acetylcholinesterase activity in primary cultures of rat substantia nigra. Histochemistry 70:7.

Lindberg, I., and Dahl, J.L. (1981). Characterization of enkephalin release from rat striatum. J. Neurochem. 36: 506-512.

- Livett, B.G., Dean, D.M., Whelan, L.G., Udenfriend, S., and Rossier, J. (1981). Co-released of enkephalin and catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Nature* 289: 317-318.
- Lorenzo, A.V., Hedley-White, E.T., Eisenberg, H.M., and Hsu, D.W. (1975). Increased penetration of horseradish peroxidase across the blood-brain barrier induced by metrazol seizures. *Brain Res.* 88: 136-140.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275..
- MacIntosh, F.C., and Oborin, P.E. (1963). Release of acetylcholine from intact cerebral cortex. *Proc. XIX Int. Congr. Union Physiol. Sci.* 580-581 (abstr.).
- Mains, R.E., Eipper, B.A., and Ling, N. (1977). Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3014-3018.
- Malfroy, B., Swerts, J.P., Guyon, A., Roques, B.P., and Schwartz, J.C. (1978). " High affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine". *Nature* 276: 523-526.
- Markelonis, G.J., and Oh, T.H. (1978). A protein fraction from peripheral nerve having neurotrophic effects on skeletal muscle cells in culture. *Exp. Neurol.* 58: 285-295.
- Martin, D.L. (1976). In: *GABA in Nervous System Function* ( E. Roberts, F.N. Chase and D.B. Tower, eds.) Raven Press, New York, pp. 347-386.
- Martin, G.E., and Haubrich, D.R. (1985). The use of push-pull perfusion techniques for measuring the efflux of (<sup>3</sup>H)dopamine in the striatum of the conscious rat. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, Orlando, Fla. pp. 293-314.
- Martin-R., and Voigt, K.H. (1981). Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. *Nature* 289: 102.
- Matsas, R., Fulcher, I., Kenny, J., and Turner, A. (1983). Substance P and leu-enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3111-3115.
- Matthews, M.R., and Cuello, A.C. (1982). Substance P-immunoreactive peripheral branches of sensory neurons innervate guinea pig sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1668-1672.
- Max, S.R., and Albuquerque, E.X. (1975). Neurotrophic regulation of acetylcholinesterase in regenerating skeletal muscle. *Exp. Neurol.* 49 : 52-857.

McGeer, P.L., McGeer, E.G., Wada, J.A., and Jung, E. (1971). Effects of globus pallidus lesions and Parkinsons disease on brain glutamic acid decarboxylase. Brain Res. 32: 425-431.

McGeer, P.L., Fibiger, H.C., Maler, M., Hattori, T., and McGeer, E.G. (1974). Evidence for descending pallido-nigral GABA-containing neurons. In: Advances in Neurology ( F. MacDowell and A. Barbeau, eds.) Raven Press, New York, Vol. 3, pp. 153-163.

McGeer, P.L., and McGeer, E.G. (1975). Evidence for glutamate acid decarboxylase-containing interneurons in the neostriatum. Brain Res. 91: 331-335.

McGuire, J.C., Greene, L.A., and Furano, A.V. (1978). NGF stimulates incorporation of fucose or glucosamine into an external glycoprotein in cultured rat PC12 pheochromocytoma cells. Cell 15: 357-365.

McKelvy, J.F. (1986). Inactivation and metabolism of neuropeptides. In: Annual Review of Neuroscience (W.M. Cowan, E.M. Shooter, C.F. Stevens, R.F. Thompson, eds.) Annual Reviews Inc. Cal. Vol. 9, pp. 415-434.

McLaughlin, B.J., Wood, J.G., Saito, K., Barber, R., Vaughn, J.E., Roberts, E., and Wu, J.Y. (1974). The fine structural localization of glutamate decarboxylase in synaptic terminals of rodent cerebellum. Brain Res. 76: 377-391.

McLaughlin, B.J., Barber, R., Saito, K., Roberts, E., and Wu, J.Y. (1975). Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat spinal cord. J. Comp. Neurol. 164: 305-322.

Mecker, R., and Myers, R.D. (1979). In vivo (<sup>14</sup>C) amino acid profiles in discrete hypothalamic regions during push-pull perfusion in the unrestrained rat. Neuroscience 4: 495-506.

Mercer, L., Del Fiacco, M., and Cuello, A.C. (1979). The smooth endoplasmic reticulum as a possible storage site for dendritic dopamine in substantia nigra neurons. Experimentia 25: 101.

Miller, R.J., Chang, K.J., Cuatrecasas, P., Wilkinson, S., Lowe, L., Beddell, C., and Follenfant, R. (1975). In: "Centrally Acting Peptides" MacMillan, London, pp. 195-213.

Minchin, M.C.W. (1975). Factors influencing the efflux of (<sup>3</sup>H) gamma-aminobutyric acid from satellite glial cells in rat sensory ganglia. J. Neurochem. 24: 571-577.

Mizobe, F., and Livett, B.G. (1980). Production and release of acetylcholinesterase by primary cells culture of bovine adrenal medullary chromaffin cells. J. Neurochem. 35: 1469-1472.

Mizobe, F., and Livett, B.G. (1983). Nicotine stimulates secretion of both catecholamines and acetylcholinesterase from cultured adrenal chromaffin cells. J. Neurosci. 3: 871-876.

Mizuno, K., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. (1980). A new family of endogenous "big" (Met)enkephalins from bovine adrenal medulla: purification and structure of docosa-(BAM22P) and eicosapeptide (BAM20P) with very potent opiate activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97 : 1283-1290.

Moore, B.W. (1973). Brain-specific proteins. In: *Proteins of the Nervous System* (D.M. Schneider, R.H. Angeletti, R.A. Bradshaw, A. Grasso and B.W. Moore, eds.) Raven Press, New York, pp. 1-12.

Moore, B.W. (1975). Brain-specific proteins: S-100 protein, 14-3-2 protein, and glial fibrillary protein. *Adv. Neurochem.* 1: 137-155.

Moore, K.E., and Nielsen, J.A. (1985). Pharmacologically induced changes in the efflux of metabolites of dopamine and 5-hydroxytryptamine from the brains of freely moving rats. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, Orlando, Fla. pp. 177-200.

Moroni, F., Cheney, D.L., Peralta, E., and Costa, E. (1978). Opiate receptor agonist as a modulators of  $\gamma$ -aminobutyric acid turnover in the nucleus caudatus, globus pallidus and substantia nigra of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207: 870-877.

Moroni, F., Peralta, E., Cheney, D.L., and Costa, E. (1979). On the regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid neurons in caudatus, pallidus and nigra: effects of opioids and dopamine agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208: 190-194.

Morrisey, J.J., and Cohn, D.V. (1978). The effects of calcium and magnesium on the secretion of parathormone and parathyroid secretory protein by isolated porcine parathyroid cells. *Endocrinology* 103:2081-2090.

Morrisey, J.J., Hamilton, J.W., and Cohn, D.V. (1978). The secretion of parathormone and glycosylated proteins by parathyroid cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82: 1279-1286.

Morrisey, J.J., Shofstall, R.E., Hamilton, J.M., and Cohn, D.V. (1980). Synthesis, intracellular distribution, and secretion of multiple forms of parathyroid secretory protein I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6406-6410.

Mudge, A.W., Leeman, S.E., and Fisbach, G.D. (1979). Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 526-530.

Musick, J.R., and Hubbart, J.I. (1972). Release of protein from mouse motor nerve terminals. *Nature* 237: 279-281.

Musick, J.R. (1979). Correlated release of acetylcholine and proteins from the neuromuscular junction. *Am. J. Physiol.* 236: c255-c262.

Myers, R.D., and Beleslin, D.B. (1970). The spontaneous release of 5-hydroxytryptamine and acetylcholine within the diencephalon of unanesthetized Rhesus monkey. *Exptl. Brain Res.* 11: 549-552.

Myers, R.D. (1972). Methods for perfusing different structures of the brain. In: *Methods in Psychobiology* (R.D. Myers, ed.) Academic Press, New York, Vol. 2, pp. 169-211.

Myers, R.D., and Drucker-Colin, R.R., eds. (1974). "Neurohumoral coding of brain function", 480 pp. Plenum Press, New York.

Naber, D., Cohen, R.M., Picker, D.X., Kline, W.H., Davies, G., Pert, C.B., and Bunney, W.E. (1981). Episodic secretion of opioid activity in human plasma and monkey CSF: evidence for a diurnal rhythm. *Life Sci.* 28 : 931-935.

Nagy, J.I., Vincent, S.R., Lehmann, J., Fibiger, H.C., and McGeer, E.G. (1978). The use of kainic acid in the localization of enzymes in the substantia nigra. *Brain Res.* 149: 431-441.

Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N., and Numa, S. (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- $\beta$ -lipotropin precursor. *Nature* 278: 423-427.

Nakanishi, S., Teranishi, Y., Watanabe, Y., Notake, M., Noda, M., Kakidani, I., Jingami, H., and Numa, S. (1981). Isolation and characterization of bovine corticotropin/ $\beta$ -lipotropin precursor gene. *Eur. J. Biochem.* 15 : 429-438.

Nakata, Y., Kusaka, Y., Yajima, H., and Segawa, T. (1981). Active uptake of substance P carboxy-terminal heptapeptide (5-11) into rat brain and rabbit spinal cord slices. *J. Neurochem.* 37: 1529-1534.

Neal, M.J., and Bowery, N.J. (1979). Differential effects of veratridine and potassium depolarization on neuronal and glial GABA release. *Brain Res.* 167: 337-343.

Negro-Vilar, A. (1982). The median eminence as a model to study presynaptic regulation of neural peptide release. *Peptides* 3: 305-310.

Nicoll, R.A., Alger, B.E., and Jahr, C.E. (1980a). Enkephalin blocks inhibitory pathways in vertebrate CNS. *Nature* 287: 22.

Nicoll, R.A., Alger, B.E., and Jahr, C.E. (1980b). Peptides as putative excitatory neurotransmitters: carnosine, enkephalin, substance P and TRH. *Proc. R. Soc. Ser. B.* 210: 132.

Nieoullon, A., Chéramy, A., and Glowinski, J. (1977). An adaptation of the push-pull cannula method to study the in vivo release of  $^3\text{H}$ -dopamine synthesized from  $^3\text{H}$ -tyrosine in cat caudate nucleus; effect of various physical and pharmacological treatments. *J. Neurochem.* 28: 819-828.

Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, Toyosato, M., Hirosoe, T., Inayama, S., Nakanishi, S., and Numa, S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295: 202-206.

North, R.A., and Tonini, M. (1979). *Brit. J. Pharmacol.* 18: 45-48.

Obata, K., and Takeda, K. (1969). Release of  $\gamma$ -aminobutyric acid into the fourth ventricle induced by stimulation of the cat's cerebellum. 16 : 1043-1047.

Obata, K. (1976). Excitatory effects of GABA. In: *GABA in Nervous System Function* ( E. Roberts, T.N.Chase and D.B.Tower, eds.) Raven Press, New York, pp. 283-286.

Oertel, W.H., Reithmuller, G., Mugnaini, E., Schmechel, D.E., Weindl, A., Gramsch, C., and Herz, A. (1983). Opioid peptide-like immunoreactivity localized in GABAergic neurons of rat neostriatum and central amygdaloid nucleus. *Life Sci.* 33 (suppl.) : 73-76.

Oertel, W.H., and Mugnaini, E. (1984). Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci. Lett.* 47: 233-238.

Okada, Y., Nitsh-Hassler, C., Kim, J.S., Bak, I., and Hassler, R. (1971). The role of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system. I. Regional distribution of GABA in rabbit, rat and guinea pig brain. *Exp. Brain Res.* 13: 514.

Okada, Y. (1976). Role of GABA in the substantia nigra. In: "*GABA in Nervous System Function*" (E. Roberts, T.N.Chase and D.B. Tower, eds.) Raven Press, New York.

Oksenberg, A. (1987). Liberación in vivo de proteínas de nueva síntesis del sistema nervioso central. Desarrollo metodológico. Tesis, UNAM.

Osborne, H., Höllt, V., and Herz, A. (1978). Potassium-induced release of enkephalins from rat striatal slices. *Eur. J. Pharmacol.* 48:219-221.

Osborne, H., Höllt, V., and Herz, A. (1980).  $K^+$ -evoked release of Met-enkephalin from rat striatum in vitro: effect of putative neurotransmitters and morphine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310:203-209.

Osborne, H., and Herz, A. (1980).  $K^+$ -evoked release of met-enkephalin from rat striatum in vitro: effect of putative neurotransmitters and morphine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310: 203-209.

Pacheco, M.F., Woodward, D.J., McKelvy, J.F., Griffin, W.S.T. (1981). TRH in rat cerebellum: II. Uptake by cerebellar slices. *Peptides* 2: 283-288.

Oppenheimer, J.R., Heisey, S.R., Jordan, E.F., and Downer, J. de C. (1962). Perfusion of the cerebral ventricular system in unanesthetized goats. *Am. J. Physiol.* 203: 763-774.

- Pasik, P., Pasik, T., and DiFiglia, M. (1979). The internal organization of the neostriatum in mammals. In: *The Neostriatum* (I. Divac, ed.) Pergamon Press, Oxford.
- Pelletier, G., and LeClerc, R. (1979). Localization of Leu-enkephalin in dense core vesicles of axons terminals. *Neurosci. Lett.* 12: 159-163.
- Pepper, C.M., and Henderson, G. (1980). Opiates and opioids peptides hyperpolarize locus coeruleus neurons in vitro. *Science* 209: 394.
- Perez de la Mora, M., Fuxe, K., Hökfelt, T., and Ljungdahl, A. (1975). Effect of apomorphine on the GABA turnover in the DA cell group rich areas of the mesencephalon. Evidence for the involvement of an inhibitory GABAergic feedback control of the ascending DA neurons. *Neurosci. Lett.* 1: 109-114.
- Perez de la Mora, M., Possani, L.D., Tapia, R., Terán, L., Palacios, R., Fuxe, K., Hökfelt, T., and Ljungdahl, A. (1981a). "Demonstration of central  $\gamma$ -aminobutyric-containing nerve terminals by means of antibodies against glutamate decarboxylase". *Neuroscience* 6: 875-895.
- Perez de la Mora, M., Fuxe, K., Hökfelt, T., Andersson, K., Possani, L., and Tapia, R. (1981b). GABAergic synapses: distribution and interaction with other neurotransmitters systems in the brain. In: *Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission* (R. Tapia and C.W. Cotman, eds.) Plenum Publishing Corporation, pp. 71-100.
- Pert, C.B., and Snyder, S.H. (1973). "Opiate receptor: demonstration in nervous tissue". *Science* 179: 1011-1014.
- Philippu, A., Przuntek, H., and Roensberg, W. (1973). Superfusion of the hypothalamus with gamma-aminobutyric acid: effect on the release of noradrenaline and blood pressure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 276: 103-118.
- Philippu, A. (1985). The use of push-pull cannulae for superfusing various hypothalamic areas in anesthetized and conscious, freely moving animals. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, Orlando Fla. pp. 221-232.
- Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., Leeman, S.E., and Miller, R.J. (1979). Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons. *Brain Res.* 160: 387.
- Pickel, V.M., Sumal, K.K., Bechley, S.C., Miller, J., and Reis, D.J. (1980). Immunocytochemical localization of enkephalin in the neostriatum of rat brain: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 189: 721-740.
- Plattner, F., and Hintner, A. (1930). Die spaltung von acetylcholin durch organextrakte und korpreflussigkeiten. *Pflugers Arch. Ger. Physiol.* 225: 19-25.

- Pollard, H., Llorens-Cortes, C., and Schwartz, J.C. (1977). Enkephalin receptors on dopaminergic neurons in rat striatum. *Nature* 268:745-747.
- Pycock, C., Horton, R.W., and Marsden, C.D. (1976). The behavioural effects of manipulating GABA function in the globus pallidus. *Brain Res.* 116 : 353-359.
- Pycock, C. (1980). Turning behaviour in animals. *Neuroscience* 5:461.
- Ramirez, U.D. (1985). The push-pull perfusion technique in neuroendocrinology. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, Orlando Fla. pp. 249-270.
- Randic, M., and Miletic, V. (1978). Depressant actions of methionine-enkephalin and somatostatin in cat dorsal horn neurones activated by noxious stimuli. *Brain Res.* 152: 196-202.
- Redgrave, P. (1985). Technical issues associated with push-pull perfusion in unanesthetized and unrestrained animals. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, Orlando Fla. pp. 11-23.
- Reiffenstein, R.J. (1979). Release of exogenous  $\gamma$ -( $^3\text{H}$ )aminobutyric acid during seizure activity in chronically denervated and normal cat cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 798-803.
- Reubi, J.C., Iversen, L.L., and Jessel, T.M. (1977). Dopamine selectively increases  $^3\text{H}$ -GABA release from slices of rat substantia nigra in vitro. *Nature* 268: 652-654.
- Ribak, C.E., Vaughn, J.E., Saito, K., Barber, R., and Roberts, E. (1976). Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat substantia nigra. *Brain Res.* 116: 287-298.
- Ribak, C.E., Vaughn, J.E., Saito, K., Barber, R., and Roberts, E. (1977). Glutamate decarboxylase localization in neurons of the olfactory bulb. *Brain Res.* 126: 1-18.
- Ribak, C.E., Vaughn, J.E., and Saito, K. (1978). Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 140: 315-332.
- Ribak, C.E., Vaughn, J.E., and Roberts, E. (1979). The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* 187: 261-284.
- Richter, J.A., Wesch, D.L., and Frederickson, R.C.A. (1979).  $\text{K}^+$ -stimulated release of Leu- and Met-enkephalin from rat striatal slices: lack of effect of morphine and naloxone. *Eur. J. Pharmacol.* 56: 105-113.



- Richter-Landsberg, C., Lee, V.M., Salton, S.R.J., Shelanski, M.L., and Greene, L.A. (1984). Release of the NILE and other glycoproteins from cultured PC12 rat pheochromocytoma cells and sympathetic neurons. *J. Neurochem.* 43: 841-848.
- Roberts, E., and Fraenkel, S. (1950). "  $\gamma$ -aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid". *J. Biol. Chem.* 187: 65-69.
- Roberts, E., Chase, T.N., and Tower, D.B. (1976). In: *GABA in the Nervous System Function* (E. Roberts, T.N. Chase and D.B. Tower, eds.) Raven Press, New York.
- Roberts, E. (1978). " Interrelationship of GABA neurons explored by immunocytochemical techniques". In: *Interactions between putative neurotransmitters in the brain* ( S. Garattini, J.F. Pujol and R. Samanin, eds.) Raven Press, New York, pp. 89-107.
- Roberts, F., Hill, R.C., Osborne, R.H., and Mitchell, J.F. (1979). The effect of depolarizing potassium concentrations on the efflux of GABA from rat dorsal medulla in vivo and from slices and synaptosomes. *Brain Res.* 178: 467-477.
- Roberts, J.L., Herbert, H. (1977a). Characterization of a common precursor to corticotropin and  $\beta$ -lipotropin: cell-free synthesis of the precursor and identification of corticotropin peptides in the molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4826-4830.
- Roberts, J.L., Herbert, H. (1977b). Characterization of a common precursor to corticotropin and  $\beta$ -lipotropin: identification of  $\beta$ -lipotropin peptides and their arrangement relative to corticotropin in the synthesized in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5300-5304.
- Roberts, J.L., Seeburg, P.H., Shine, J., Herbert, E., Baxter, J.D., Goodman, H.M. (1979). Corticotropin and  $\beta$ -endorphin: construction and analysis of recombinant DNA complementary to mRNA for the common precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2153-2157.
- Ross, D.H. (1978). In: *Calcium in drug action* (G.B. Weiss, ed.) Plenum Press, New York, pp. 241-259.
- Rossier, J., Vargo, T.M., Minick, S., Ling, N., Bloom, F.E., and Guillemin, R. (1977). Regional dissociation of beta-endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5162-5165.
- Rossier, J., Audiger, Y., Ling, N., Cros, J., and Udenfriend, S. (1980). Met-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>, present in high amounts in brain of rat, cattle and man, is an opioid agonist. *Nature* 288: 88-90.
- Rotundo, R.L., and Fambrough, D.M. (1980a). Synthesis, transport and fate of acetylcholinesterase in cultured chick embryo muscle cells. *Cell* 22: 583-594.

- Rotundo, R.L., and Fambrough, D.M. (1980b). Secretion of acetylcholinesterase: relation to acetylcholine receptor metabolism. *Cell* 22: 595-602.
- Roy, B., Jamal, I., and Go, J. (1982). Synaptic mechanism of methionine-enkephalin uptake. *Brain Res.* 31: 2307-2310.
- Rusca, G., Calissano, P., and Alemá, S. (1972). Identification of a membrane bound fraction of the S-100 protein. *Brain Res.* 49: 223-227.
- Ruwe, W.D., Veale, W.D., Pittman, Q.J., Kasting, N.W., and Lederis, K. (1985). Release of arginine-vasopressin from the brain: correlation with physiological events. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, Orlando Fla. pp. 223-248.
- Ryan, L.D., and Rskoski, R. (1975). Selective release of newly synthesized and newly captured GABA from synaptosomes by potassium depolarization. *Nature* 258: 254-256.
- Sastry, B.R. (1979). Presynaptic effects of morphine and methionine-enkephalin in feline spinal cord. *Neuropharmacology* 18: 367-375.
- Sawynok, J., Labella, F.S., and Pinski, C. (1980). Effects of morphine and naloxone on the  $K^+$ -stimulated release of methionine-enkephalin from slices of rat corpus striatum. *Brain Res.* 189: 483-493.
- Sawynok, J., and Labella, F.S. (1981). GABA and baclofen potentiate the  $K^+$ -evoked release of methionine-enkephalin from rat striatal slices. *Eur. J. Pharmacol.* 70: 103-110.
- Schaffner, A.E., and Daniels, M.P. (1982). Conditioned medium from cultures of embryonic neurons contains a high molecular weight factor which induces acetylcholine receptor aggregation on cultured myotubes. *J. Neurosci.* 2: 623-632.
- Scheel-Krüger, J., Arnt, J., Braestrup, C., Christensen, A.V., and Magerlund, G. (1979). Development of new animal models for GABAergic actions using muscimol as a tool. In: *GABA-Neurotransmitters, Pharmacological and Biochemical Aspects* (P. Krosggaard-Larsen, J. Scheel-Krüger and H. Kofod, eds.) Benzon Symposium Munksgaard, Copenhagen. Vol. 12, pp. 447-464.
- Schneider, F.H., Smith, A.D., and Winkler, H. (1967). Secretion from adrenal medulla: biochemical evidence for exocytosis. *Brit. J. Pharmacol. Chemotherap.* 31: 94-104.
- Schoener, E.P. (1985). Neuronal responses to neuroactive substances administered by push-pull perfusion. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, Orlando Fla. pp. 25-39.
- Schwartz, J.C., Malfroy, B., and De la Baume, S. (1981). Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl carboxypeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. *Life Sci.* 29: 1715-1741.

Seizinger, B.R., Holtt, V., Herz, A. (1981a). Evidence of the occurrence of the opioid octapeptide dynorphin-(1-8) in the neurointermediate pituitary of rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 197-205

Seizinger, B.R., Holtt, V., and Herz, A. (1981b). Immunoreactive dynorphin in the rat adenohypophysis consist exclusively of 6000-dalton species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 256-263.

Shashoua, V.E. (1979). Brain metabolism and the acquisition of new behaviours. III. Evidence for secretion of two proteins into the brain extracellular fluid after training. *Brain Res.* 166: 349-358.

Shashoua, V.E., Hesse, G.W., and Moore, B.E. (1984). Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J. Neurochem.* 42: 1536-1541.

Shaw, S.G. (1978). D.Phil. Thesis, Oxford University.

Sheppard, M.C., Kronheim, S., and Pimstone, B.C. (1979). Effect of substance P, neurotensin and the enkephalins on somatostatin release from the rat hypothalamus in vitro. *J. Neurochem.* 32: 647.

Silver, A. (1974). "The biology of the cholinesterase" Elsevier, Amsterdam.

Simantov, R., Snowman, A.M., and Snyder, S.H. (1976). A morphine-like factor "enkephalin in rat brain: subcellular localization". *Brain Res.* 107: 650-657.

Simantov, R., Kuhar, M.J., Uhl, G.R., and Snyder, S.H. (1977). Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2167-2171.

Simmonds, M.A. (1980). Evidence that bicuculline and picrotoxin act at separate sites to antagonize  $\gamma$ -aminobutyric acid in rat cuneate nucleus. *Neuropharmacol.* 19: 39.

Singer, M. (1969). Penetration of labelled amino acids into the peripheral nerve fiber from surrounding body fluids. In: *Growth of the Nervous System* (G.E. Wolstenholme and M.O. Connor, eds.) Churchill, London. pp.200-215.

Singer, M., and Steinberg, M.C. (1972). Wallerian degeneration reevaluation based on transected and colchicine poisoned nerves in amphibian triturus. *Am. J. Anat.* 133: 51-84.

Sivam, S.P., and Hong, J-S. (1986). GABAergic regulation of enkephalins in rat striatum: alterations in Met-enkephalin level, precursor content and preproenkephalin messenger RNA abundance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237: 326-331.

Sjölund, B., Terenius, L., and Eriksson, M. (1977). Increased cerebrospinal fluid levels of endorphins after electro-acupuncture. *Acta Physiol. Scan.* 100: 382-384.

- Skau, K.A., and Brimijoin, S. (1978). Release of acetylcholinesterase from rat hemidiaphragm preparations stimulated through the phrenic nerve. *Nature* 275: 224-226.
- Small, D.H., Ismael, Z., and Chubb, I.W. (1986). Acetylcholinesterase hydrolyses chromogranin A to yield low molecular weight peptides. *Neuroscience* 19: 289-295.
- Smith, A.D., De Potter, W.P., Moerman, E.J., and De Schaepdryver, V. (1970). Release of dopamine- $\beta$ -hydroxylase and chromogranin an upon-stimulation of the splenic nerve. *Tissue Cell* 2: 547-567.
- Smith, A.D. (1979). The release of catecholamines from adrenergic neurons. In: *Biochemical Studies of the Mechanism of release* (D.M. Paton, ed.) Pergamon Press, Oxford, pp. 1-15.
- Somogyi, P., Priestley, J.V., Cuello, A.C., Smith, A.D., and Takagi, H. (1982). Synaptic connections of enkephalin-immunoreactive nerve terminals in the neostriatum: a correlated light and electron microscopic study. *J. Neurocytol.* 11: 779-807.
- Sosa, R.P., McKnight, A.T., Hughes, J., and Kosterlitz, H.W. (1977). Incorporation of labelled amino acids into the enkephalins. *FEBS Lett.* 84 : 195-198.
- Starke, K. (1977). Regulation of noradrenaline released by presynaptic receptor system. *Rev. Physiol. Biochem.* 77: 1-124.
- Stern, A.S., Lewis, R.V., Kimura, S., Rossier, J., Stein, S., and Udenfriend, S. (1980). Opioid hexapeptides and heptapeptides in adrenal medulla and brain possible implications on the biosynthesis of enkephalins. *Arch. Biochem. Biophys.* 205: 606-613.
- Storm-Mathisen, J. (1972). Glutamate decarboxylase in the rat hippocampal region after lesions of the afferent fibre systems: evidence that the enzyme is localized in intrinsic neurons. *Brain Res.* 40:215-235.
- Storm-Mathisen, J. (1976). Distribution of the components of the GABA system in neuronal tissue: cerebellum and hippocampus-effects of axotomy. In: *GABA in Nervous System Function* (E. Roberts, T.N. Chase and D.B. Tower, eds.) Raven Press, New York, pp. 148-168.
- Suda, T., Tozawa, F., Tachibana, S., Demura, H., Shizume, K. (1982). Multiple forms of immunoreactive dynorphins in rat pituitary and brain. *Life Sci.* 31: 51-57.
- Sullivan, S., Akil, H., and Barchas, J.D. (1978). In vitro degradation of enkephalin: evidence for cleavage at the Gly-Phe bond. *Commun. Psychopharmacol.* 2: 525-531.
- Swartzwelder, H.S. (1985). Hippocampal involvement in the effects of ethyl alcohol: in vivo and in vitro levels of analysis. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, Orlando Fla. pp. 201-220.

- Sweadner, K.J. (1981). Environmentally regulated expression of soluble extracellular proteins of sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* 258 : 4063-4070.
- Sweadner, K.J. (1983a). Post-translational modifications and evoked release of two large surface proteins of sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 3: 2504-2517.
- Sweadner, K. (1983b). Size, shape, and solubility of a class of releasable cell surface proteins of sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 3:2518-2524.
- Takeda, M., Takeda, F., Matsumoto, F., Tunak, R., and Kono, K. (1982). "Divalent cation, ATP-dependent <sup>3</sup>H-Leu-enkephalin uptake by synaptic vesicle forebrain isolated from bovine caudate nucleus. *Brain Res.* 234: 319 - 326.
- Takeuchi, A. (1976). Studies of inhibitory effects of GABA in invertebrate nervous system. In: *GABA in Nervous System Function* (E. Roberts, T.N. Chase and D.B. Tower, eds.) Raven Press, New York, pp. 225-267.
- Tapia, R. (1975). Biochemical pharmacology of GABA in CNS. In: *Handbook of Psychopharmacology* (L. Iversen, S. Iversen and S. Snyder, eds.) Plenum Press, New York, Vol. 4, pp. 1-58.
- Tapia, R. (1976). In: *Transport Phenomena in the Nervous System* (G. Levi, L. Battistin and A. Lajtha, eds.) Plenum Press, New York, pp. 385-394.
- Tapia, R., and Gonzalez, R.M. (1978). *Neurosci. Lett.* 10:171-174.
- Tapia, R. (1980). In: *Neurochemistry and Clinical Neurology* (L. Battistin, S. Hashim and A. Lajtha, eds.) Alan R. Liss, New York, pp. 123-131.
- Tapia, R. (1983). "γ-aminobutyric acid: metabolism, and biochemistry of synaptic transmission" In: *Handbook of Neurochemistry* (A. Lajtha, ed.) Plenum Press, New York, Vol. 3, pp. 423-466.
- Thorn, N. (1966). In vitro studies of the release mechanism for vasopressin in rats. *Acta Endocrinol.* 53: 644-654.
- Thornton, V.F. (1982). Stimulation of calcium-dependent release of labeled protein from pulse-labelled mouse pituitary intermediate lobe tissue. *J. Physiol.* 329: 425-437.
- Tower, D.B. (1976). In: *GABA in Nervous System Function* (E. Roberts, T.N. Chase and D.B. Tower, eds.) Raven Press, New York, pp. 461-478.
- Tsukada, T., Nakai, Y., Jingami, H., Imura, H., Taii, S., Nakanishi, S., Nuna, S. (1981). Identification of the mRNA coding for the ACTH-β-lipotropin precursor in human ectopic ACTH-producing tumor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98: 525-540.

- Uhl, G.R., Kuhar, M.J., and Snyder, R.H. (1978). Enkephalin-containing pathway: amigdaloid efferents in the stria terminalis. *Brain Res.* 149: 223-228.
- Ungerstedt, U. (1971). Post-synaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. (suppl.)* 367: 69.
- Ungerstedt, U., and Zetterström, T. (1982). Brain dialysis. A new in vivo technique for studying neurotransmitter release and metabolism. *Neurosci. Lett. (suppl.)* 10: 5493 (abstr).
- Urca, G., Yitzhaky, J., and Frenk, H. (1981). Different opioid systems may participate in post-electroconvulsive shock (ECS) analgesia and catalepsy. *Brain Res.* 219: 385-396.
- Van der Berg, C.J., Matheson, D.F., Ronda, G., Reijnierse, G.L.A., Blokhuis, G.G.D., Kroon, M.C., Clarke, D.D., and Garfinkel, D. (1975). In: "Metabolic Compartmentation and Neurotransmission" (S. Berl, D.D. Clarke and D. Schneider, eds.) Plenum Press, New York, pp. 515-543.
- Van der Heyden, J.A.M., de Kloet, E.R., Korf, J., and Verteeg, D.H.G. (1979a). GABA content of discrete brain nuclei and spinal cord of the rat. *J. Neurochem.* 33: 857-861.
- Van der Heyden, J.A.M., Venema, K., and Korf, J. (1979b). In vivo release of endogenous GABA from rat substantia nigra measured by a novel method. *J. Neurochem.* 32: 469-476.
- Van der Heyden, J.A.M., Venema, K., and Korf, J. (1980a). Biphasic and opposite effects of dopamine and apomorphine on endogenous GABA release in the rat substantia nigra. *J. Neurochem.* 34: 119-125.
- Van der Heyden, J.A.M., Venema, K., and Korf, J. (1980b). In vivo release of endogenous GABA from rat striatum; inhibition by dopamine. *J. Neurochem.* 34: 1338-1341.
- Van der Heyden, J.A.M., Venema, K., and Korf, J. (1980c). In vivo release of endogenous GABA from rat striatum: effects of muscimol, oxotremorine and morphine. *J. Neurochem.* 34: 1648-1653.
- Van der Heyden, J.A.M., Venema, K., Lebrun, P., Sebens, J.B., and Korf, J. (1981). Release of endogenous GABA from the rat brain: methodological aspects and the effects of catecholamines. In: "Amino acid Neurotransmitters" (F.V. De Feudis and P. Mandel, eds.) Raven Press, New York. Vol. 29, pp. 193-203.
- Van der Heyden, J.A.M., Venema, K., and Korf, J. (1985). Push-pull perfusion studies on the in vivo release of endogenous transmitter and non-transmitter amino acids in the rat brain. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, New York, pp. 51-68.

- Velasco, M., Velasco, F., Pacheco, M.T., and Estrada-Villanueva, F. (1985). The efficacy of the push-pull perfusion technique in the study of sleep, epilepsy, and tremor. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.) Academic Press, Orlando Fla. pp. 271-291.
- Velluci, S.V., and Webster, R.A. (1980). Studies on GABA release in vivo using a simple method for perfusing of the fourth ventricle of the rat. *Neuropharmacol.* 19:1099-1104.
- Vigny, M., DiGiamberardino, L., Couraud, J.Y., Rieger, F., Koenig, J. (1976). Molecular forms of chicken acetylcholinesterase: effect of denervation. *FEBS Lett.* 69:277.
- Viveros, O.H., Argueras, L., and Kirshner, N. (1968). Release of catecholamines and dopamine  $\beta$ -oxidase from the adrenal medulla. *Life Sci.* 7: 609-618.
- Viveros, O.H., Diliberto, E.J., Hazum, E., and Chang, K.J. (1979). Opiate-like materials in the adrenal medulla: evidence for storage and secretion with catecholamines. *Mol. Pharmacol.* 16: 1101-1108.
- Watt, C.B., Su, Y.Y.T., and Lamm, D.M.K. (1984). Interactions between enkephalins and GABA in avian retina. *Nature* 311: 761-763.
- Watt, C.B., Su, Y.Y.T., and Lam, D.M.K. (1985a). Enkephalins in the vertebrate retina. *Prog. Retinal Res.* 4: 221-242.
- Watt, C.B., Su, Y.Y.T., and Lamm, D.M.K. (1985b). Opioid pathways in an avian retina. II. The synaptic organization of enkephalin-immunoreactive amacrine cells. *J. Neurosci.* 5: 857-865.
- Weber, E., Evans, C.J., Barchas, J.D. (1982). Predominance of the amino-terminal heptapeptide fragment of dynorphin in rat brain regions. *Nature* 299: 77-79.
- Weiss, G.B. (1974). *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 14: 343-354.
- Weinshilboum, R.M., Thoa, N.B., Johnson, D.G., Kopin, I.J., Axelrod, J. (1971). Proportional release of norepinephrine and dopamine hydroxylase from sympathetic nerve. *Science* 174: 1349-1351.
- Vesche, D.L., and Frederickson, R.C.A. (1981). Diurnal rhythm in response to noxious stimuli-increase of met-enkephalin in globus pallidus. In: *'Advances in Endogenous and Exogenous Opioids'* (Proc. Int. Narcotic Res. Conf.) Kodansha, Tokyo, pp. 232-234.
- Veston, P., and Greenfield, S.A. (1986). Release of acetylcholinesterase in the nigrostriatal pathway: relation to receptor activation and firing rate. *Neuroscience* 17: 1079-1088.
- White, J.D., Stewart, K.D., Krause, J.E., and McKelvy, J.F. (1985). Biochemistry of peptide-secreting neurons. *Physiol. Rev.* 65: 553-606.

- Whitfield, P.L., Seeburg, P.H., Shine, J. (1982). The human pro-opiomelanocortin gene: organization, sequence and interspersions with repetitive DNA. *DNA* 1: 133-136.
- Williams, J.T., Katayama, Y., and North, R.A. (1979). Effects of endorphins on single myenteric neurons. *Brain Res.* 165: 57.
- Wilson, S.P., Klein, R.L., Chang, K-J., Gasparis, M.S., Viveros, O.H., and Yang, W.H. (1980). Are opioid peptides co-transmitters in noradrenergic vesicles of sympathetic nerves? *Nature* 288: 707-709.
- Wroblewski, F., and La Due, J.S. (1955). Lactate dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90: 210-213.
- Yaksh, T.L., Felde, L.A., and Yamamura, H.I. (1973). Recovery of cholinesterase activity in the cerebrospinal fluid, brainstem and plasma of the unanesthetized cat after irreversible cholinesterase inhibition. *Experientia* 30:38-39.
- Yaksh, T.L., and Yamamura, H.I. (1974). Factors affecting performance of the push-pull cannula in brain. *J. Appl. Physiol.* 37:428-434.
- Yaksh, T.L., and Elde, R.P. (1980). Release of methionine-enkephalin immunoreactivity from the rat spinal cord in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 63:359-362.
- Yang, H-Y, T., and Neff, N.H. (1972). Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. *J. Neurochem.* 19:2443.
- Yang, H-Y, T., Hong, J.S., and Costa, E. (1977). Regional distribution of LEU and MET enkephalin in rat brain. *Neuropharmacol.* 16(4): 303-307.
- Yang, H-Y, T., Hong, J.S., Fratta, W., and Costa, E. (1978). Rat brain enkephalins: distribution and biosynthesis. *Adv. Biochem. Pharmacol.* 18: 149-159.
- Younkin, S.G., Brett, R.S., Davey, B., and Younkin, L.H. (1978). Substances moved by axonal transport and released by nerve stimulation have an innervation-like effect on muscle. *Science* 200:1291-1295.
- Zahm, D.S., Alones, V.E., and Heimer, L. (1985). Evidence for the coexistence of glutamate decarboxylase and Met-enkephalin immunoreactivities in axon terminals of rat ventral pallidum. *Brain Res.* 325:317-321.
- Zetterstrom, T., Vernet, L., Ungerstedt, U., Tossman, U., Jonzon, B., and Freholm, B.B. (1982). Purine levels in the intact rat brain. Studies with and implanted perfused hollow fibre. *Neurosci. Lett.* 29:111-115
- Zieglgänsberger, W., and Bayerl, H. (1976a). The mechanism of inhibition of neuronal activity by opiates in the spinal cord of cat. *Brain res.* 115:111.



Zieglgänsberger, W., and Fry, J.P. (1976b). In: Opiates and endogenous opiate peptides (H.W. Kosterlitz, ed.), Elsevier/North Holland, pp. 213.

Zieglgänsberger, W., French, E.D., Siggins, G.R., and Bloom, F.E. (1979). Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons, Science 205:45.