

00361
25
zej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CUANTIFICACION REGIONAL DE IR-MET, IR-LEU-ENCEFALINA EN EL
CEREBRO DE LA RATA DURANTE EL DESARROLLO Y
EL ESTABLECIMIENTO DEL KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO.

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias
Biología Celular.

PRESENTA:

Q.F.B. Rosalva Esther Talavera Cuevas.

1 9 8 9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

00361

25

zej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CUANTIFICACION REGIONAL DE IR-MET, IR-LEU-ENCEFALINA EN EL
CEREBRO DE LA RATA DURANTE EL DESARROLLO Y
EL ESTABLECIMIENTO DEL KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO.

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias
Biología Celular.

PRESENTA:

Q.F.B. Rosalva Esther Talavera Cuevas.

1 9 8 9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

RESUMEN.....	10
--------------	----

INTRODUCCION.....	11
-------------------	----

CAPITULO 1 El Kindling. Modelo Experimental de Epilepsia

1) Generalidades	13
2) Características de Estimulación	14
3) Aspectos Filogenéticos	15
4) Cambios Conductuales	16
5) Cambios Fisiológicos	18
6) Ventajas del Kindling.....	20

CAPITULO 2 Péptidos Opioides

1) Generalidades	22
2) Biosíntesis	24
3) Liberación de Encefalinas	32
4) Receptores Opioides	33
5) Degradación de las Encefalinas	38

CAPITULO 3 Encefalinas y Epilepsia

1) Farmacología	41
2) Efecto de los opiáceos y opioides en el proceso del kindling.....	43
Bioquímica	44

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	47
----------------------------------	----

HIPOTESIS.....	48
----------------	----

OBJETIVO.....	49
---------------	----

CAPITULO 4 Material y Métodos

1) Sujetos Experimentales.....	50
2) Grupos Experimentales.....	50
3) Procedimiento Quirúrgico.....	51
4) Estimulación Amigdalina.....	52
5) Sacrificio y Disección.....	54

6) Extracción de Encefalinas del Tejido Cerebral	54
7) Purificación por Cromatografía de Adsorción.....	55
8) Cuantificación de encefalinas por Radioinmunoanálisis..	56
9) Análisis Estadísticos	56

CAPITULO 5 Resultados

1) Desarrollo del kindling Amigdalino	58
2) Cuantificación Regional	
a) IR-Met-Encefalina.....	62
b) IR-Leu-Encefalina.....	65

DISCUSION	67
------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	74
---------------------------	-----------

ARTICULOS PUBLICADOS

RESUMEN

Diversos reportes en la literatura sugieren que los péptidos opioides endógenos participan en el proceso de la epilepsia.

La estimulación eléctrica repetida de baja intensidad, de la amígdala cerebral, produce actividad epiléptica que se incrementa en su duración y frecuencia a lo largo de las estimulaciones y culmina con crisis convulsivas generalizadas. Este fenómeno, al cual se le ha denominado efecto "kindling", constituye un modelo experimental de epilepsia y permite estudiar los cambios conductuales, electroencefalográficos y bioquímicos concomitantes al proceso de epileptización.

En este trabajo se describen los cambios que se producen en la concentración de metionina y leucina-encefalina, en varias estructuras cerebrales y en diferentes etapas del kindling eléctrico amigdalino es decir, durante las fases iniciales de desarrollo, la primera crisis convulsiva, después de varias crisis convulsivas y 21 días después de haber presentado la décima crisis. Esto permitió analizar las variaciones que ocurren durante el proceso de epileptización y el posible efecto de permanencia de dichos péptidos en el kindling establecido.

Los animales de experimentación se consideraron según el estado del kindling en los siguientes grupos: control (C), falso operado (FO), fase de desarrollo (2-3), primera crisis generalizada (1CG), 10 crisis generalizadas (10 CG), y animales con 10 crisis generalizadas y sacrificados 21 días después del último estímulo (PERM). Las estructuras analizadas fueron: estriado, amígdala, hipotálamo, tallo cerebral, hipocampo, cerebro medio, corteza cerebral y médula espinal. La cuantificación de ambas encefalinas se llevó a cabo por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

Los resultados obtenidos muestran que en la amígdala y en el hipocampo las concentraciones de Leu-encefalina aumentan progresiva y significativamente desde las fases de desarrollo (2-3). Estos cambios se relacionan con el incremento de la excitabilidad durante el proceso del kindling. Por el contrario en el cerebro medio, disminuye la concentración de dicho péptido en los grupos 1CG y PERM. Esta disminución también se observa en la corteza cerebral en el grupo 1CG. La cuantificación de Met-encefalina en la amígdala, aumentó en los grupos 2-3, 1CG, 10CG y PERM. Mientras que en el hipocampo, el hipotálamo aumentó y en el estriado aumentó únicamente en los grupos 10CG y PERM, y en el tallo cerebral, en los grupos 2-3 y PERM. En la médula espinal, los cambios no fueron significativos para ninguno de los péptidos.

Finalmente estos resultados sugieren que las encefalinas pueden participar en el desarrollo y en la instalación del kindling eléctrico amigdalino, así como en algunas etapas de las crisis convulsivas. Además muestran un efecto regional y diferencial en cada péptido estudiado. Lo anterior permite sugerir que el recambio de estos péptidos es diferente y depende de las estructuras y sus funciones específicas.

I N T R O D U C C I O N

La epilepsia es considerada como un síndrome de disfunción cerebral de carácter recurrente, caracterizada por la activación sincrónica de grupos neuronales que descargan a frecuencias más altas de las que se encuentran durante su funcionamiento normal. En términos generales se ha considerado que la hiperactividad neuronal que caracteriza a la epilepsia resulta: (1) de un aumento en la neurotransmisión excitatoria, ó (2) de una falla en las funciones inhibitorias (Ver referencias en: Fernández-Guardiola., 1986; Brailowsky y col., 1989).

La necesidad de conocer los mecanismos por los cuales se produce esta patología, así como la limitación natural que existe al intentar estudiarla en los humanos mediante técnicas invasivas, hicieron necesario el desarrollo de modelos experimentales de epilepsia, los cuales intentan reproducir los aspectos más característicos de cada uno de los síndromes epilépticos.

Uno de estos modelos es el denominado "Kindling" ó encendido (Goddard y col., 1969), el cual se induce aplicando estimulaciones eléctricas repetidas, subconvulsivas, en ciertas áreas cerebrales, principalmente límbicas. Dichas estimulaciones producen cambios conductuales y electroencefalográficos que culminan en crisis convulsivas generalizadas. El "kindling" ofrece varias ventajas para su estudio al ser comparado con otros modelos experimentales de epilepsia. Este modelo: 1) se puede inducir por la estimulación de un área específica del cerebro (Goddard y col., 1969), 2) Presenta un desarrollo gradual y

progresivo el cual puede ser caracterizado por diferentes estadios conductuales, 3) produce cambios que son irreversibles y permanentes, 4) Su desarrollo gradual permite estudiar los cambios conductuales, electroencefalográficos y bioquímicos que se producen en los procesos epilépticos.

El estudio sobre los aspectos bioquímicos en el kindling ha permitido conocer la participación de diferentes sustancias neurotransmisoras o neuromoduladoras en el fenómeno epiléptico, por ejemplo el GABA, la serotonina, las catecolaminas y más recientemente los neuropéptidos. A este último grupo pertenecen los opioides endógenos, específicamente las encefalinas, las cuales han sido consideradas como sustancias neurotransmisoras o neuromoduladoras que participan en el fenómeno epiléptico.

Para conocer el papel que tienen las encefalinas en los procesos de la epilepsia, se decidió estudiar en la rata con diferentes grados de epileptización (utilizando la técnica del kindling), los cambios en la concentración de estos péptidos en diferentes estructuras cerebrales, partiendo del supuesto de que las modificaciones en la concentración de las encefalinas puede ser regional y estar en función del grado de epileptización de los animales.

Así el objetivo de este trabajo fué el de investigar los cambios que se producen en la concentración de la IR-Metionina e IR-Leucina-encefalina en estructuras cerebrales de la rata durante el desarrollo, las crisis motoras generalizadas repetidas y el posible efecto de permanencia a lo largo del kindling eléctrico amigdalino.

CAPITULO 1

EL Kindling. Modelo Experimental de Epilepsia.

1) Generalidades

La inducción de crisis convulsivas generalizadas por medio de estimulaciones eléctricas focales en el cerebro se llevó a cabo por numerosos investigadores en los años 50s y 60s. Delgado y Sevillano (1961) demostraron que la estimulación eléctrica en el hipocampo inducía una intensificación progresiva de la actividad de la crisis convulsiva producida por el estímulo. La importancia de esta observación fué reconocida por Goddard y col.(1969), quienes describen por primera vez el fenómeno del "kindling", proponiéndolo como un modelo experimental de epilepsia, de aprendizaje y memoria. A diferencia de los trabajos previos, estos autores utilizaron estimulaciones eléctricas de baja intensidad (subumbrales).

El término "kindling" se refiere a los cambios electroencefalográficos (EEG) y conductuales progresivos, que resultan de la estimulación eléctrica repetida de ciertas áreas cerebrales, principalmente límbicas. Dicha estimulación es de baja intensidad, y provoca posdescargas que inicialmente son de corta duración; la amplitud de las espigas que la constituyen es baja y existe poca ó ninguna propagación hacia otras regiones cerebrales. Asimismo, los cambios conductuales concomitantes con las posdescargas son discretos al inicio del kindling, pero cuando los estímulos se aplican repetidamente, se da un

incremento progresivo en la intensidad de estas respuestas.

La respuesta máxima provocada por el kindling es una crisis convulsiva generalizada tónico clónica. El umbral para su instalación es estable y menor al umbral de la posdescarga inicial lo cual sugiere un fenómeno de facilitación. La sucesión de los eventos conductuales que preceden a cada crisis generalizada, replica todos los estadios conductuales del proceso del kindling. Estas crisis son de carácter permanente, es decir, si se interrumpe la estimulación durante varios meses, al aplicarla nuevamente, las crisis convulsivas generalizadas (CCG) se presentan con un número menor de estimulaciones. Otra característica del " Kindling " es que las CCG pueden aparecer de manera espontánea (Goddard y col., 1969; Racine, 1972b).

2) Características de estimulación

Se ha demostrado que algunas condiciones experimentales son importantes en el proceso del kindling. Entre ellas podemos enumerar las siguientes:

1^o La región cerebral estimulada tiene una importante relación con la rapidez de la instalación del kindling así como sus correlatos conductuales. Goddard y col. (1969), encontraron que la amígdala del lóbulo temporal es el sitio donde el proceso del kindling, determinado a partir del número de estimulaciones, progresa más rápidamente. Las estructuras que le siguen en orden decreciente son: el globo pálido, corteza piriforme, área olfatoria, neocorteza anterior, corteza entorinal, bulbo olfatorio, Área septal, Área preóptica, caudo putamen, y el hipocampo (Goddard y col., 1969).

Por otra parte, se ha mostrado que en la mayor parte del tallo cerebral, cerebelo, tálamo, núcleo rojo y sustancia nigra no es posible producir el kindling, tomado este como modelo experimental de epilepsia (Goddard y col., 1969).

2o Las características del estímulo eléctrico son determinantes para el desarrollo del kindling. El paradigma experimental más utilizado consiste en la administración periódica a intervalos regulares de un tren de 1 seg de duración constituido por pulsos bifásicos de 1 mseg con una frecuencia de 60 Hz y una intensidad que puede ser desde los 20 A a los 400 A. Esto depende del umbral de la posdescarga, en el sitio de estimulación.

3o El intervalo de tiempo entre cada estímulo es una de las características clave para el desarrollo del kindling. Goddard y col. (1969) compararon la eficacia de los estímulos aplicándolos a diferentes intervalos. Los intervalos de 24 horas ó más son igualmente efectivos. Pero cuando estos son de 12 horas ó menos se requieren más estimulaciones. Las aplicaciones de estimulaciones a intervalos menores de 20 minutos provocan la inhibición de las posdescargas y por lo tanto del proceso del kindling (Goddard y col., 1969, Racine y col., 1973).

3) Aspectos Filogenéticos

El kindling ha sido inducido en diferentes especies: reptiles, anfibios, cuyes, ratones, ratas, conejos, felinos, caninos y primates. Debido a razones prácticas, la rata es la especie más comunmente empleada para el kindling, aunque también

lo son el gato y los primates. La secuencia de las etapas conductuales, así como el tiempo requerido para producir este fenómeno, varía dependiendo de la especie animal estimulada (Ver bibliografía en McNamara y col., 1980; Joy., 1985).

En general el kindling ocurre más rápidamente conforme la escala filogenética desciende de primates a roedores y de éstos hacia especies no mamíferas (Wada, 1978). (Ver cuadro I).

CUADRO I

Número aproximado de estímulos con intervalos de 24 horas para el establecimiento del kindling amigdalino.

ESPECIE	NUMERO
Rata	8 - 12
Gato	18 - 30
Primate Babuinos	60 - 70
Primate Mono rhesus	150- 200

4) Cambios Conductuales

La expresión conductual que se produce en el kindling presenta etapas características que se manifiestan de una manera gradual y progresiva. La clasificación conductual más ampliamente utilizada en la rata es la descrita por Racine, (1972 b). Sin embargo, Joy (1985) ha hecho una clasificación más detallada de las diferentes conductas que se presentan en los diferentes estadios. En el cuadro II se presentan ambas clasificaciones.

CUADRO II

Clasificación: Racine (1972b)

Joy (1985)

*ESTADIOS

C O N D U C T A

0		Ninguna respuesta al estímulo
I	Movimientos faciales y de boca.	Postura de descanso durante y después de la estimulación. Cierre del ojo ipsilateral, clonus faciales, olfateo, masticación.
II	Movimientos verticales de la cabeza.	Vigorosos movimientos de masticación, balanceo de la cabeza y clonus de cuello. Sacudidas de cabeza que se acompañan usualmente con espigas que aparecen en la posdescarga (PD).
III	Mioclónias de los miembros anteriores.	Clonus de miembros anteriores unilaterales ó bilaterales.
IV	Postura de sentado con extensión del cuerpo en posición vertical.	Levantamiento de miembros anteriores con posición casi vertical del cuerpo.
V	Levantamientos repetidos sobre las patas traseras y caída.	Levantamiento seguido por la pérdida de equilibrio y caída.
VI		Levantamiento y caída repetidos.
VII		Ataque de carrera similar al provocado por estimulación audiogénica en el cual los sujetos corren rápidamente en círculos, saltos violentos, y/o vueltas repetidas.
VIII		Ataque de carrera como en el estadio anterior que involucra períodos de tono al comienzo y al final de la crisis.

* Cada estadio conductual incluye a los precedentes.

5) Cambios Fisiológicos

Los tres principales efectos de la estimulación tipo kindling son: 1) el descenso en el umbral para provocar la posdescarga 2) el alargamiento en la duración de la posdescarga y 3) la propagación de la actividad epiléptica hacia otras áreas del cerebro. Cada uno de estos efectos puede ser considerado como un ejemplo del cambio cerebral hacia la epilepsia (Goddard y col., 1969; Racine, 1972 a,b; Burnham, 1976).

Los mecanismos que subyacen al kindling aún no han sido bien determinados. El kindling parece depender al menos de dos propiedades neuronales: la potenciación a largo plazo y el desarrollo de respuestas en salva (Racine y col. 1981).

La potenciación a largo plazo se refiere al incremento de respuestas sinápticas provocadas por la estimulación repetida, un ejemplo de esto es el aumento considerable de la amplitud de las espigas epiléptiformes, particularmente en el sitio secundario (Racine, 1972b; 1981).

La respuesta en salva se refiere a un cambio en la respuesta neuronal provocado por una excitación aferente repetida, que induce la aparición de una salva de potenciales de acción de alta frecuencias (Racine y col, 1981; Joy, 1985). Con registros unitarios del sitio primario o de sitios secundarios se ha verificado la presencia de respuestas en salva que incrementan progresivamente la frecuencia de sus potenciales de acción, conforme se desarrolla el kindling (Racine, 1978).

Otro cambio funcional inducido por el kindling es el fenómeno de transferencia. Este fenómeno consiste en un incremento en la susceptibilidad al desarrollo de crisis en los sitios secundarios. Se ha demostrado que el desarrollo del kindling es más fácil cuando este proceso ya se ha establecido mediante la estimulación de otra área cerebral ipsi ó contralateral (Goddard y col., 1969; Racine 1972b; Burnham, 1976).

Burnham (1976) estudió este proceso y encontró que la transferencia ocurre entre todos los sitios límbicos analizados (amígdala, área septal, hipocampo dorsal y ventral) sin importar que estructura fuese escogida como sitio primario o secundario para el proceso del kindling.

El kindling induce cambios permanentes en la función neuronal de otras estructuras que son probablemente el resultado de las conexiones entre una región y otra. Se ha propuesto que estos cambios pueden tener correlatos morfológicos (a largo plazo) ó neuroquímicos (inmediatos y a largo plazo). Los cambios morfológicos propuestos son la generación de nuevos arreglos de circuitos neuronales, que podrían ser el resultado de: a) el aumento de las conexiones entre una región y otra, b) el aumento de espinas dendríticas y de una nueva formación de sinápsis, o c) de una modificación de las sinápsis existentes, tal vez por crecimiento de las terminales presinápticas o por un incremento en la superficie receptiva postsináptica ó en el número de receptores (Joy, 1985)

Algunos investigadores no han podido verificar cambios morfológicos consistentes a consecuencia del kindling y postulan que los cambios involucrados se deben al incremento de la

eficacia sináptica ó de la respuesta postsináptica (McNamara y col., 1980; Joy, 1985). Sin embargo, Racine y Zaide (1978) encontraron que el kindling se acompaña del desarrollo de contactos sinápticos, al hacer una evaluación mediante la microscopía electrónica. Estos autores encontraron que el kindling cortical provoca el aumento significativo del tamaño de las terminales sinápticas en el tejido neocortical estimulado.

6) Ventajas del kindling

Los datos antes mencionados hacen del fenómeno "kindling" un modelo de epilepsia permanente, semejante a ciertos tipos de epilepsia que ocurren en el hombre. La ventaja del fenómeno "Kindling" sobre otros modelos de epilepsia experimental, como los producidos por compuestos químicos, es la posibilidad de ejercer un mayor control de las variables experimentales, el sitio de estimulación está bien definido, permite el control adecuado de los parámetros de estimulación y de las respuestas que se provocan durante el fenómeno progresivo del kindling. Esto permite tener animales en las mismas circunstancias experimentales y con los mismos grados de epileptización.

Por otro lado, la estabilidad del fenómeno y su progresiva evolución permite el análisis de las propiedades anticonvulsivantes de algunos agentes farmacológicos, ya sea en forma preventiva (efectos ejercidos durante el desarrollo) ó supresivos (en convulsiones ya establecidas) (Racine y col., 1975). Además, debido a su evolución paulatina ha sido muy empleado en el estudio de los mecanismos fisiológicos y

bioquímicos que están involucrados en la actividad paroxística.

Con respecto a los correlatos neuroquímicos se han estudiado varios sistemas de neurotransmisores. En el capítulo siguiente nos referiremos solamente a lo que concierne a los péptidos opioides y en especial a las encefalinas como sustancias neurotransmisoras.

CAPITULO 2

PEPTIDOS OPIOIDES

1) Generalidades

El estudio de los efectos analgésicos de los opiáceos, así como su capacidad para producir toxicomanía, dieron origen a una gran cantidad de investigaciones que tuvieron como propósito encontrar opiáceos sintéticos que mantuvieran sus propiedades analgésicas pero que carecieran de sus efectos indeseables.

El hecho de que las drogas, las hormonas y los neurotransmisores producen sus efectos altamente selectivos a concentraciones muy bajas al interactuar con sus receptores específicos, hizo suponer la existencia de receptores para los opiáceos en el cerebro y posiblemente también en otros tejidos. No fue hasta los 70's cuando varios grupos de investigación (Terenius 1974; Pert y Snyder 1973; Simon y col., 1973) detectaron sitios de unión estereoespecíficos para la morfina y otras drogas analgésicas sintéticas en membranas de células nerviosas.

Este hallazgo sugirió la presencia, en el cerebro, de una sustancia natural similar a la morfina, quizás un neurotransmisor que actuara uniéndose al receptor específico. Hughes y col. (1975), lograron extraerlo y obtener su secuencia a partir de extractos cerebrales de cerdo. Dicho factor estaba constituido por dos pentapéptidos a los cuales denominaron encefalinas (del griego "en la cabeza"). Estos péptidos

presentan la siguiente secuencia de aminoácidos:

NH - Tir - Gli - Gli - Fen - Met - COOH

NH - Tir - Gli - Gli - Fen - Leu - COOH

Al primer pentapéptido le denominaron metionina encefalina y al segundo leucina encefalina. Estas dos sustancias fueron sintetizadas y probadas en los ensayos biológicos de la vasa deferente de ratón y el ileum de cobayo y mostraron una actividad opiácea potente (Waterfield y col., 1977).

A partir de entonces se han aislado alrededor de 40 péptidos endógenos que se unen a los mismos receptores que el opio, por lo cual se les ha denominado opioides endógenos, a diferencia del opio y sus derivados sintéticos a los cuales se les denomina opiáceos.

Actualmente se tienen bastantes pruebas de que las encefalinas actúan como sustancias neurotransmisoras ó neuromoduladoras ya que cumplen con las siguientes características:

- a) Se sintetizan en las neuronas
- b) Se han encontrado en terminales sinápticas dentro de vesículas ó gránulos de secreción.
- c) Se liberan por depolarización eléctrica y con altas concentraciones de potasio. Su liberación es calcio dependiente y está asociada a gránulos de secreción.

d) Al ser aplicados exógenamente, producen efectos similares a los provocados por las encefalinas endógenas

e) Una vez que ejercen su acción, se ha observado su inactivación por peptidasas que las hidrolizan.

Estos criterios son los que han sido propuestos para identificar a cualquier sustancia que se considere como neurotransmisora.

En la siguiente sección de esta tesis se revisan algunos de los aspectos más relevantes de los péptidos opioides, concernientes a su biosíntesis, liberación, tipo de receptores y degradación.

2) Biosíntesis

Se ha establecido que los péptidos biológicamente activos son sintetizados a partir de grandes moléculas precursoras (Ver bibliografía en Herbert y Uhler, 1982). Este proceso biosintético incluye la transferencia de la prohormona del retículo endoplásmico rugoso (RER) al aparato de Golgi de donde sale y se almacena en los gránulos secretorios previo a su liberación por exocitosis. El procesamiento post-traducciona l de la promolécula ocurre durante la migración desde el RER hacia el exterior de la célula, con pasos individuales de maduración (hidrólisis, sulfatación, glicosilación, amidación etc.), localizados dentro de compartimentos intracelulares que contienen los sistemas enzimáticos apropiados. Estos eventos determinan el tipo de péptidos que produce en una neurona dada, su potencia, selectividad por el receptor y función (Fig. 1).

Rompimiento del péptido señal.
N-glicosilación, enrrollamiento proteico, formación de uniones disulfuro

Sulfatación, O-glicosilación, Fosforilación

Acetilación
Amidación
Exoproteólisis
Endoproteólisis

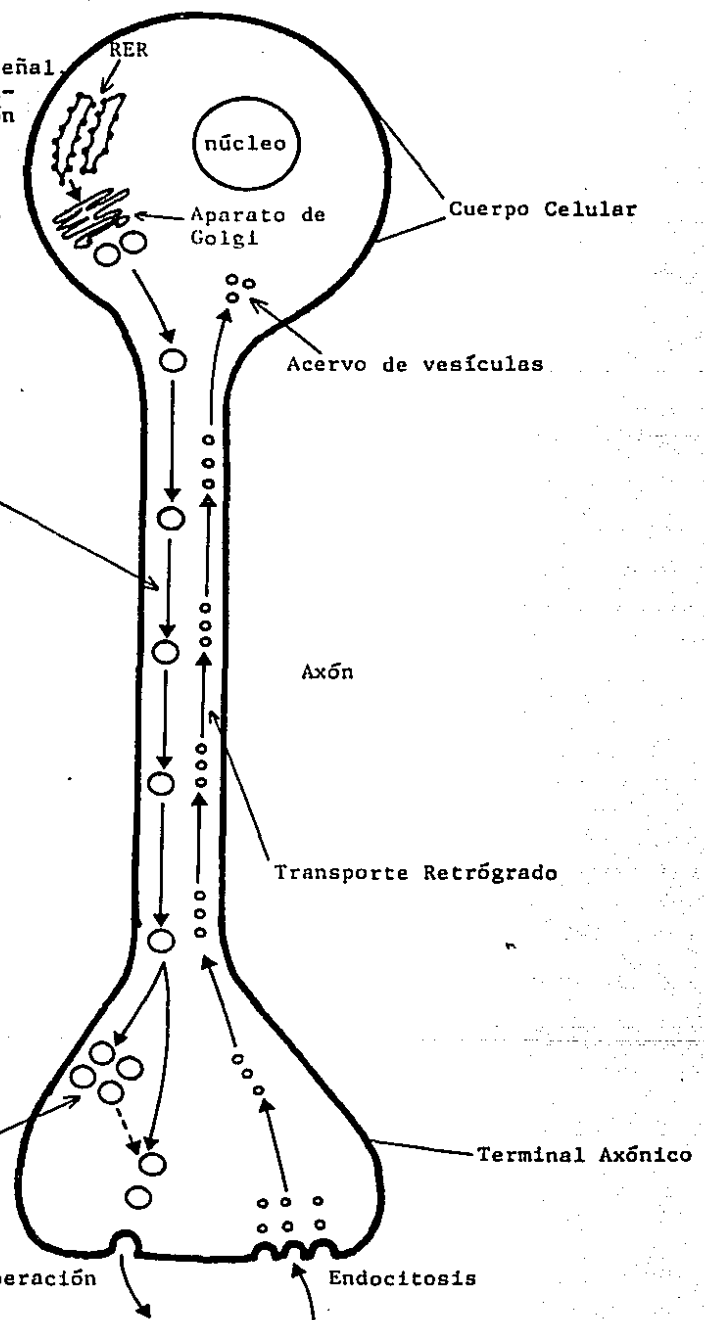


Fig. 1 Representación esquemática de algunos eventos celulares y etapas del procesamiento en la biosíntesis de los péptidos (tomada de Iversen, 1980).

El interés de varios grupos de investigación sobre la biosíntesis de las encefalinas dió como resultado el aislamiento de un gran número de péptidos, los cuales tenían como característica común poseer dentro de su molécula una ó varias secuencias de la Met ó Leu-encefalina. Sin embargo la relación que había entre estos péptidos no se conocía. La utilización de las técnicas de clonación y el análisis de la secuencia del DNA clonado (cDNA), permitieron establecer la estructura molecular de las tres proteínas precursoras a partir de las cuales se producen los péptidos opioides. Estas proteínas son la Proopiomelanocortina (POMC), la Proencefalina A y la Prodinorfina (ó Proencefalina B).

La POMC fué la primera de las proteínas precursoras caracterizadas por (Mains y col., 1977). El gen fué clonado y obtenida su secuencia en 1979 por el grupo de Nakanishi. Esta molécula contiene en su secuencia a varios péptidos activos, al opioide B-endorfina así como a la hormona ACTH (adrenocorticotropa) y a varias formas de la hormona melanocito estimulante -alfa, beta y gamma- (Fig. 2).

Posteriormente el cDNA que codifica para la proencefalina A fué clonado y obtenida su secuencia a partir de tejido proveniente de médula adrenal de humano y de bovino, así como de cerebro de rata (Noda y col. 1982 a,b; Gubler y col., 1982; Comb y col., 1982). La secuencia aminoácida pronosticada por estos DNAs (cDNA) es estremadamente homóloga. El polipéptido tiene un peso molecular de 30 Kdaltons y contiene dentro de su secuencia, cuatro copias de Met-encefalina, una sóla copia de

Leu-encefalina, Met-encefalina-Arg-Gly-Leu (octapéptido), Met-encefalina-Arg-Phe (heptapéptido) y sin-encefalina (proencefalina 1-70) (Fig. 2).

En médula adrenal de bovino han sido aislados polipéptidos que son productos intermediarios del procesamiento de la proencefalina "A". Estos son de alto peso molecular 23.3, 18.2, 12.6 y 8.6 Kdaltons, y también han sido encontrados en el cerebro. Sin embargo, aunque se ha demostrado que la proencefalina A es idéntica en adrenal y tejido cerebral, Liston y col.(1984), reportaron que el procesamiento de esta molécula puede ser diferente en ambos tejidos, ya que se ha encontrado que una gran proporción de los péptidos producidos en el cerebro tienen bajo peso molecular.

La tercera proteína precursora es la prodinorfina ó proencefalina "B". Esta molécula no contiene Met-encefalina dentro de su secuencia pero produce principalmente tres péptidos que contienen Leu-encefalina: alfa/B-neo-endorfina, dinorfina A y leumorfina. La dinorfina puede servir como un precursor de Leu-encefalina en el cerebro pero en vista de su potente acción opiácea es probable que tengan un papel fisiológico independiente (Ver bibliografía en Golstein, 1984) (Fig 2).

Estructuralmente, como se observa en la Fig. 2, las 3 moléculas precursoras de péptidos opioides tienen varias características en común: a) peso molecular muy parecido, cercano a 30,000 daltons, b) número de aminoácidos muy similar, variando entre 209 y 267 -considerando varias especies-, c) en la mayoría de los casos, las secuencias correspondientes a péptidos biológicamente activos dentro de la secuencia del precursor están

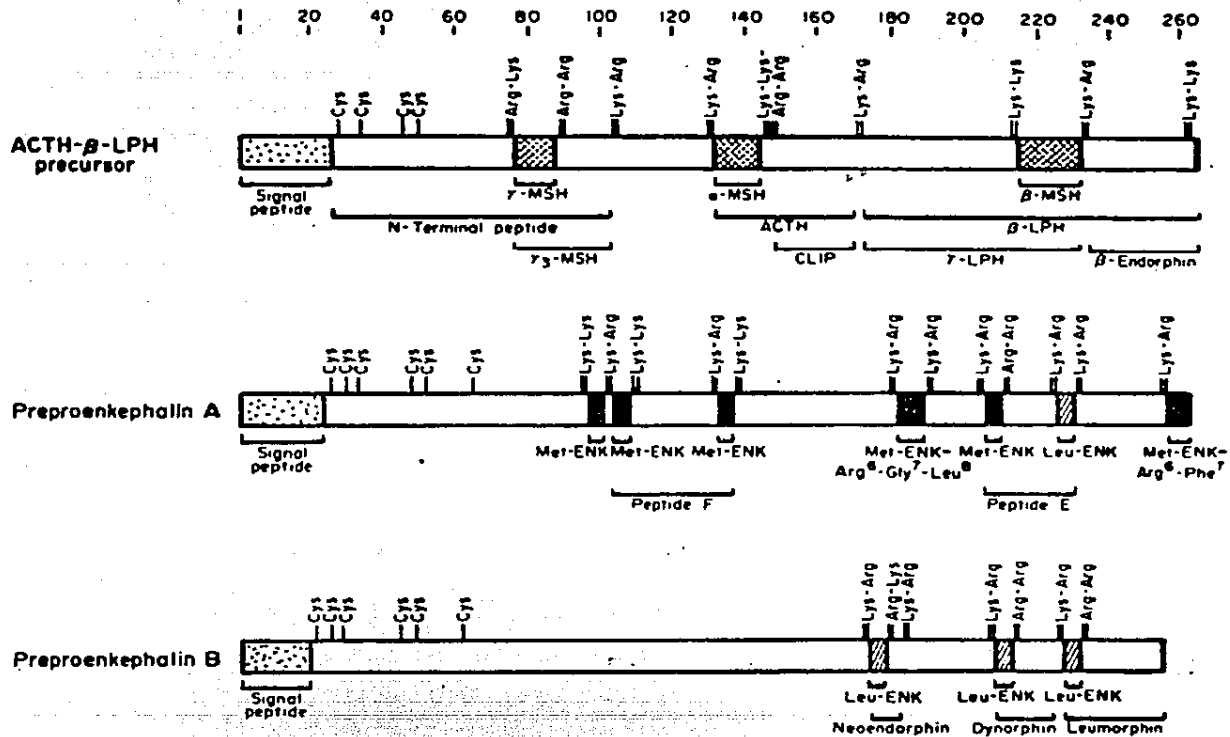


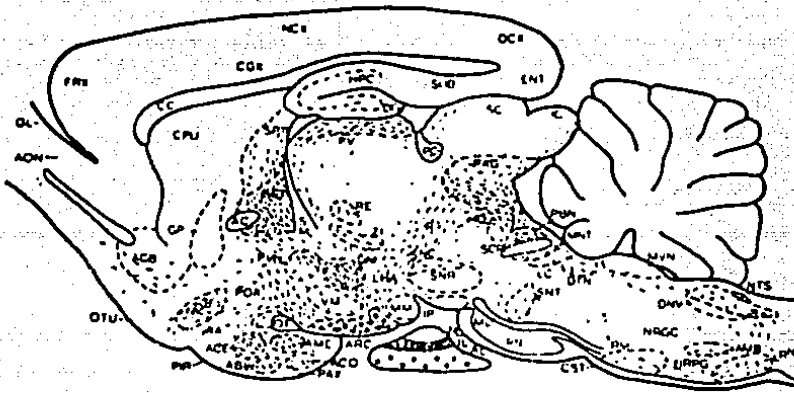
Figura 2. Representación esquemática de las estructuras de las proteínas precursoras de las tres familias de péptidos opioides. Se encuentran indicados: la localización de los péptidos biológicamente activos, limitados por un par de aminoácidos básicos; no todos los péptidos aislados se muestran; ENK es la abreviatura de Enkefalinas. Los números de la parte superior indican el No. de aminoácido. Esquema tomado de Numa, 1984.

Limitadas hacia ambos lados por pares de aminoácidos básicos, d) la región amino terminal es rica en residuos de cisteína no incluye aminoácidos de reconocimiento proteolítico típico y está precedida por una secuencia señal, de naturaleza hidrofóbica.

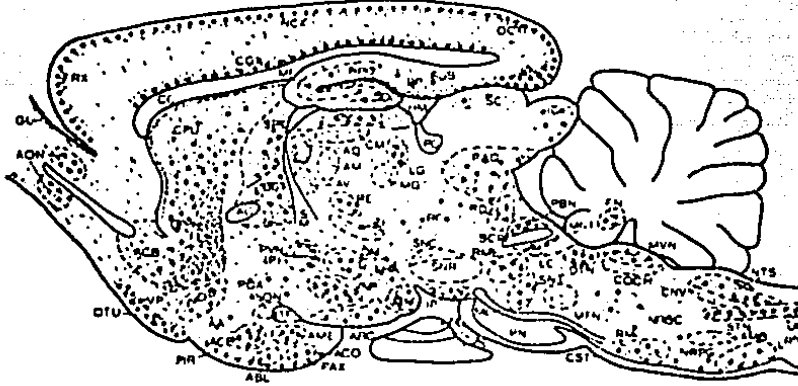
Estas similitudes sugieren una relación evolutiva entre las tres diferentes proteínas precursoras. Ellas representan una familia de genes y productos de genes funcionalmente relacionados. La significancia biológica de los precursores de multihormonas puede ser para efectos de producción simultánea de péptidos activos múltiples que realizan funciones coordinadas (Numa, 1984).

Los estudios inmunocitoquímicos indican que los tres precursores de los péptidos opioides son expresados en poblaciones neuronales distintas en el cerebro (Khachaturian 1985). La PQMC es expresada en células diferentes a las que presentan inmunoreactividad a las encefalinas. La Proencefalina A y la Proencefalina B han sido mapeadas utilizando antisueros dirigidos contra secuencias específicas para cada precursor y se han encontrado diferencias y similitudes en su localización (Figura 3).

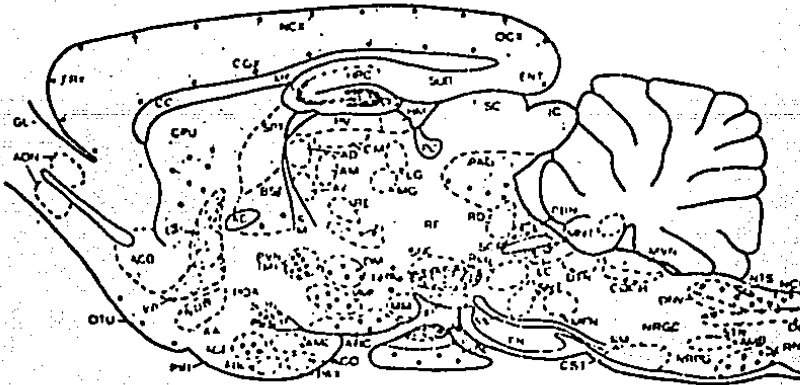
ANATOMIA DE LOS SISTEMAS OPIOIDES EN EL SNC.



PROOPIOMELANOCORTINA



PROENCEFALINA



PRODINORFINA

Figura 3 representación esquemática de la distribución de los péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina, proencefalina y prodinorfinina en el Sistema Nervioso Central de la rata, determinado por estudios inmunohistoquímicos. En estos tres mapas parasagittales, los pericarios neuronales son demostrados como círculos sólidos y las fibras terminales como líneas curvas y puntos.

SÍMBOLOS

AA: amígdala anterior, ABL: núcleo basolateral de la amígdala, AC: comisura anterior, ACB: núcleo acumbens, ACE: núcleo central de la amígdala, ACD: núcleo cortical de la amígdala, AD: Núcleo anterodorsal del tálamo, AL: lóbulo anterior de la pituitaria, AM: núcleo anteromedial del tálamo, AMB: núcleo ambiguo, AME: núcleo medial de la amígdala, AON: núcleo ofatorio anterior, ARC: núcleo arcuato, AV: núcleo anteroventral del tálamo, BST: núcleos basales de la stria terminalis, CC: cuerpo calloso, CGX: corteza del cíngulo, CM: núcleo centro-medial del tálamo, COCH: complejo nuclear coclear, CPU: caudo-putamen, CST: tracto corticoespinal, DH: dorsal de la médula espinal, DG: giro dentado, DM: núcleo dorsomedial del hipotálamo, DNV: núcleo motor dorsal del vago, DNT: núcleo tegmental dorsal, ENT: corteza entorrinal, FM: núcleo fatigal del cerebelo, FRX: corteza frontal, GL: capa glomerular del bulbo olfatorio, GP: globo pálido, HM: núcleo habenuar medial, HPC: hipocampo, IC: colículos inferior, IL: lóbulo intermedio de la pituitaria, IP: complejo nuclear interpeduncular, LC: núcleo del locus coeruleus, LG: núcleo geniculado lateral, LHA: área hipotálmica lateral, LRN: núcleo reticular lateral, MF: fibras musgosas del hipocampo, MFN: núcleos faciales motores, MG: núcleo geniculado medial, ML: lemnisco medio, MM: núcleos mamilares mediales, MNT: núcleos mesencefálicos del trigémino, MVN: núcleo vestibular medial, NCU: núcleo cuneatus, NCX: neocorteza, NDB: núcleo de la banda diagonal, NL: lóbulo neural de la pituitaria, NRG: núcleo reticularis gigante celularis, NRPG: núcleo reticularis paragigantocelularis, NTS: núcleo del tracto solitario, OCX: corteza occipital, OT: tracto óptico, OTU: tubérculo olfatorio, PAG: grey periacueductal, PAX: corteza periamigdalóide, PBN: núcleo parabraquial, PC: comisura posterior, PIR: corteza piriforme, PN: puente, POR: área preóptica, PP: rafe perforante, PV: núcleo periventricular del tálamo, PVN(M): núcleo paraventricular (pars magnocelularis), PVN (P) núcleo paraventricular (pars parvocelularis), RD: núcleo rafe dorsal, RE: núcleo reuniens del tálamo, RF: formación reticular, RM: núcleo magno del rafe, RME: núcleo mediano del rafe, SC: colículo superior, SCP: pedunculus cerebelar superior, SM: estria medularis del tálamo, SNC: sustancia negra, SNR: sustancia negra pars reticulata, SNT: núcleo sensorial del trigémino (principal), SON: núcleo supraóptico, SPT: núcleo septal, STN: núcleo espinal del trigémino, SUB: subiculum, VM: núcleo ventromedial del hipotálamo, VP: pálido ventral, ZI: zona incerta. Tomado de Khachatourian y col., (1985).

3) Liberación de Encefalinas

Como se mencionó anteriormente, para que una sustancia pueda ser considerada como neurotransmisor debe ser liberada de las terminales nerviosas.

Los estudios de distribución subcelular, demostraron que las encefalinas se localizan principalmente en la región sinaptosomal (Simantov y Snyder 1976; Osborne y col., 1978).

La liberación de estos péptidos ha sido estudiada en experimentos in vitro en rebanadas de diferentes regiones cerebrales tales como el globo pálido, el estriado, el tálamo y el núcleo acumbens (Iversen y col., 1978; Bayón y col., 1978; Osborne y col., 1978; Ritcher y col., 1979; Linberg y Dahl, 1981; Patey y col., 1981). Todos estos trabajos han mostrado que la liberación de encefalinas inducida por Potasio (22 - 50 mM) es un proceso dependiente de calcio por lo que se asume que estos neuropéptidos se comportan como otros neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC). La utilización de la técnica in vivo "push pull" en globo pálido ha corroborado estos resultados bioquímicos (Glowinski, 1981).

Otro aspecto importante es la regulación que ejercen otros compuestos sobre la liberación de encefalinas. Osborne y col. (1980), encontraron que el único neurotransmisor que tiene efecto sobre la liberación de estos péptidos es el GABA, el cual ejerce una acción inhibitoria. Sin embargo estos resultados actualmente resultan controvertidos ya que Sawynok y col. (1981), obtuvieron resultados contradictorios es decir encontraron que el GABA incrementa la liberación de encefalinas.

4) Receptores opioides

Históricamente, el descubrimiento de los receptores opioides precedió al aislamiento y caracterización de sus ligandos endógenos, los péptidos opioides.

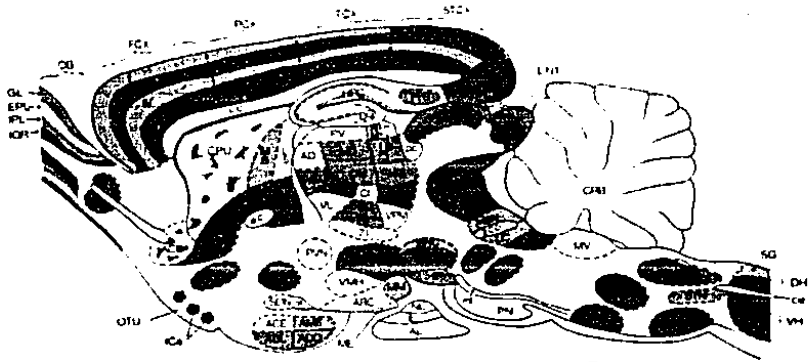
La existencia de varios tipos de receptores opiáceos fue primero postulada por Martin y col. (1974, 1976), quienes con base en el análisis de los efectos producidos por un amplio grupo de drogas narcóticas utilizando preparaciones de perros espinales crónicos, propusieron la existencia de tres tipos de receptores opioides: mu (μ) para los compuestos como la morfina, kappa (K) para las drogas como la cetociclazocina y sigma (σ) para las drogas tales como N-alilnormetazocina (SKF 10,047). Además de estas categorías, Kosterlitz y col. (1979), dieron evidencias sobre un cuarto tipo de receptor al que denominaron delta (δ).

Los resultados de los experimentos farmacológicos fueron además corroborados en ensayos de unión a receptor y estudios autoradiográficos, los cuales demostraron que los receptores mu, delta y kappa son distintos sitios de unión, que se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC y han sido localizados en diferentes especies animales (Chang y col. 1979a y b; Pert y col., 1975, 1976; Bonnet y col., 1981; Lewis y col., 1982; Ninkovic y col., 1981; Mansour y col., 1988). En la figura 4 se muestra la distribución de las densidades relativas de los receptores mu, delta y kappa en el cerebro de la rata.

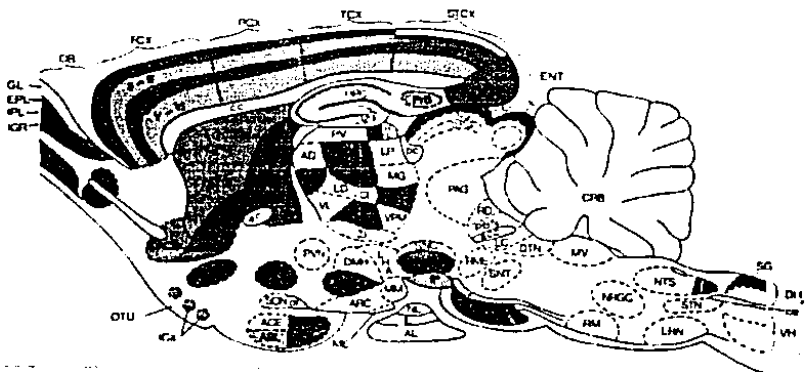
La unión mu se observa en numerosos núcleos y a varios niveles del neuroeje, incluyendo la neocorteza, caudo putamen, septum, tálamo, hipocampo, sustancia nigra, colículos superior e

DISTRIBUCION DE LOS RECEPTORES OPIOIDES

RECEPTORES MU (μ).



RECEPTORES DELTA (δ).



RECEPTORES KAPPA (κ).

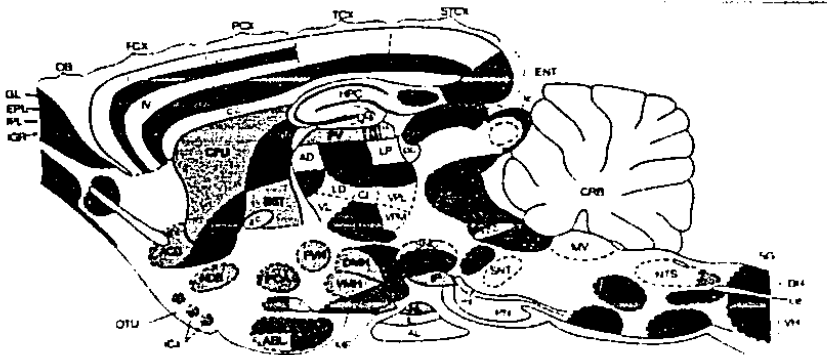


FIG. 4

Figura 4 representación esquemática de receptores opioides mu, delta y kappa en el cerebro de la rata, determinado por técnicas de autoradiografía de receptor. Para facilitar la descripción de estas distribuciones, las densidades, del receptor fueron coloreadas de acuerdo al siguiente código, con rojo= muy denso (++++), naranja=denso (+++), verde=moderado (++) , y azul=ligeró (+). Estos términos no son cuantitativos y sólo dan una medida relativa de la distribución de un receptor.

SIMBOLOS

ABL, núcleo amigdalino basolateral; AC, comisura anterior; ACB, núcleo acumbens; ACE, núcleo central amigdalino; AD, tálamo anterodorsal; AL, lóbulo anterior de la pituitaria; AME, núcleo amigdalino medio; AON, núcleo olfatorio anterior; ARC, núcleo arcuato, del hipotálamo; BST, núcleos basales de la stria terminalis; cc, cuerpo calloso; ce, canal central; CL, tálamo controlateral; CM, tálamo centromedial; CPU, caudo putamen; CRB, cerebelo; DG, girus dentado; DH, hueso de la espina dorsal; DMH, hipotálamo dorsomedial; DPG, materia gris, colículo superior; FCX, corteza frontal; ICA, islotes de calleja; IGR, capa granular intermedia, bulbo olfatorio; IL, lóbulo intermedio; IMD, tálamo intermedio dorsal; ING, capa gris intermedia, colículo superior, IP, núcleo interpeduncular; IPL, capa plexiforme intermedia, bulbo olfatorio; LC, locus coeruleus; LD, tálamo laterodorsal; LHA, área hipotalámica lateral; LP, tálamo latero posterior; LRN, núcleo reticular lateral; LS, septum lateral; MD, tálamo dorsomedial; ME, eminencia media; MG, geniculado medial; ML, lemnisco medio; MM, núcleos mamilares mediales, MS, septum medial; NV, Núcleo vestibular medial; NDB, núcleo de la banda diagonal; NL, lóbulo neural de la pituitaria; NRG, núcleo reticularis gigante celularis; NTS, núcleo del tracto solitario; OB, bulbo olfatorio; OT, tracto óptico; OTV, tubérculo olfatorio; PVN, núcleo parabraquial; PC, comisura posterior; PCX, corteza parietal; PN, puente; POA, área preóptica; PrS, presubiculum; PV, tálamo paraventricular; PVN, hipotálamo paraventricular; RD, rafe dorsal; RE, núcleo reuniens del tálamo, RM, núcleo magno del rafe; RME, núcleo mediano del rafe; SC, colículo superior; scp, pedunculo cerebelar superior; SG, sustancia gelatinosa; SNC, sustancia negra compactada; SNR, sustancia negra reticulada; STN, núcleo sensorial del trigémino; SON, núcleo supraóptico; STCX, corteza estriada; SNT, núcleo espinal del trigémino; SUG, capa gris superficial, colículo superior; TCX, corteza temporal; VH, ventral, médula espinal; VL, tálamo ventrolateral; VM, tálamo ventromedial; VMH, hipotálamo ventromedial; VP, pálido entral; VPL, tálamo ventroposterolateral; y ZI, zona incerta. (Tomada de Mansour y col., 1988).

inferior, locus coeruleus y núcleo del tracto solitario.

Los receptores delta presentan una distribución más restringida que predomina en estructuras del cerebro anterior tales como neocorteza, caudo putamen y amígdala.

Finalmente, los receptores kappa están localizados en el área preóptica, hipotálamo, eminencia media, caudo putamen, amígdala y núcleo del tracto solitario. Aunque existe una sobreposición en la localización de cada tipo de receptor, su distribución anatómica precisa varía marcadamente.

Dada la complejidad de la distribución de los receptores opioides y de las familias de péptidos en el SNC, no ha sido fácil correlacionar un sistema particular de péptidos opioides con un tipo de receptor. Las áreas de interacción péptido-receptor van a depender de los tipos de péptidos que se sintetizan y se liberan en la neurona presináptica así como de su afinidad por un receptor en particular que esté presente en la neurona post-sináptica.

En la tabla I se presenta una comparación de las densidades relativas de receptores mu, delta y kappa con las densidades relativas de POMC, pro-encefalina y pro-dinorfina en varias regiones del SNC. Esta tabla da una indicación cualitativa de lugares donde hay buena interacción péptido-receptor, así como de los sitios donde esta interacción no se da (Tomada de Mansour y col., 1988).

TABLA I: Distribución de Receptores y Péptidos Opioides en el Cerebro de la Rata.

CNS Region	Receptors			POMC	Peptides	
	μ	δ	κ		Pro-Enk	Pro-Dyn
I. Telencephalon						
Frontal cortex (laminar)	+++	++	+	0	++	+
Piriform cortex (laminar)	++	++	++	0	++	+
Entorhinal cortex (laminar)	++	++	++	0	+++	+
Amygdala						
Central nucleus	0	0	++	++++	++++	++
Medial nucleus	+++	++	++	+++	+++	+
Lateral nucleus	++++	+++	+++	++	+++	+
Hippocampal formation						
Hippocampus (laminar)	+++	++	+	0	++	+++
Dentate gyrus (laminar)	+++	+	+	0	++	+++
Olfactory tubercle	+	+++	+++	0	++	++
Nucleus accumbens	++++ (patchy)	++++	+++ (ventral)	+	+++	++
Caudate-putamen	++++ (patchy)	++++ (vent-lat)	+++ (vent-med)	0	+++ (patchy)	++
Globus pallidus	+	+	+	0	++++	+++
Medial septum	+++	+	+	+++	+++	0
Bed nucleus stria terminalis	++	++	+++	++++	+++	++
Preoptic area	+	+	++++	+++	+++	++
II. Diencephalon						
Hypothalamus						
Supraoptic nucleus	0	0	++	0	+	+++
Paraventricular nucleus	0	0	++	++++	++++	++++
Arcuate nucleus	0	0	++	+++	+++	++
Ventromedial nucleus	0	+	+++	+	+++	++
Dorsomedial nucleus	+	0	+++	++++	+++	++
Lateral hypothalamic area	+	0	++	+++	++	+++
Thalamus						
Periventricular nucleus	0	0	+++	++++	+++	+
Central-medial nucleus	++++	+	++	0	+++	0
Reuniens nucleus	++++	+	++	0	++	0
Medial habenula	+++	+	+++	0	+++	0
III. Mesencephalon						
Interpeduncular nucleus (central)	++++	+++	+++	0	+++	0
Substantia nigra						
Pars compacta	+++	0	0	+	++	+
Pars reticulata	++	+	+	0	+	++++
Ventral tegmental area	++	0	+	++	++	+
Periaqueductal gray (rostral-ventral)	+	0	++	++++	+++	++
Sup./Inf. colliculi	++++	+	++	++	+++	+
Dorsal raphe nucleus	++	0	++	+++	++	+
IV. Pons/medulla						
Parabrachial nucleus	+++	0	++	+++	+++	++
Nucleus raphe magnus	++	0	+	+	+++	++
Nucleus reticular gigantocellularis	+	0	+	++	+++	++
Nucleus tractus solitarius (caudal part)	++++	+	+++	+++	+++	+++
Lateral reticular nucleus	+	0	+	+++	+++	+
Spinal trigeminal nucleus	+++	0	++	++	++++	+++
V. Spinal cord						
Substantia gelatinosa	+++	+	++	++	++++	+++

++++=muy denso; +++=denso; ++=moderado; +=bajo; 0=no detectable.
Tomada de Mansour y col., 1988.

5) Degradación de Las encefalinas

Todo neurotransmisor después de interactuar con su receptor específico debe ser rápidamente degradado ó recapturado. En el caso de la Met- y la Leu-encefalina, se ha propuesto que estos péptidos son catabolizados en el espacio sináptico por diferentes enzimas. Estos péptidos poseen cuatro sitios susceptibles de inactivación. En la figura 5 se muestra cuales son estas enzimas, su sitio de acción y los diferentes inhibidores que se han utilizado en cada caso.

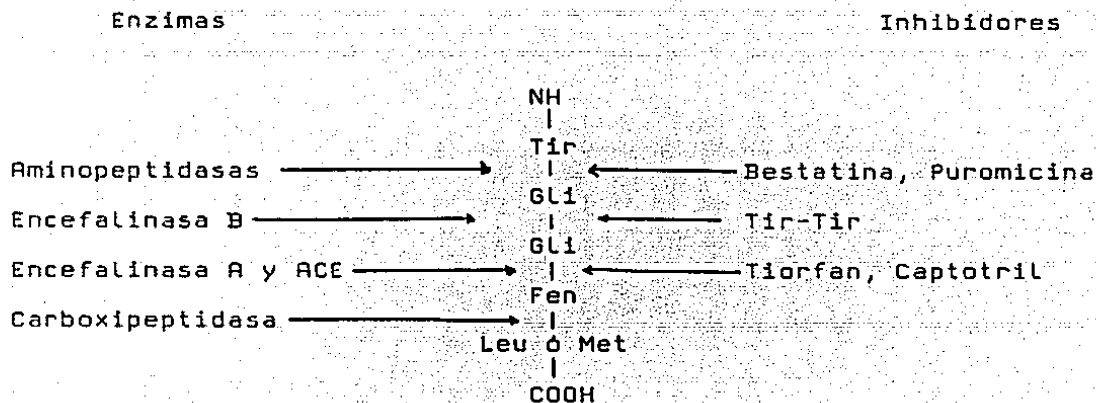


Fig. 5 Enzimas que degradan a las encefalinas y sus inhibidores.

Las aminopeptidasas fueron las primeras enzimas identificadas que hidrolizan a las encefalinas y han sido aisladas a partir de tejido cerebral. Existen cuando menos cinco tipos, todas ellas son metaloenzimas, solubles y aunque su especificidad es diferente todas muestran alta afinidad por las encefalinas (Hersh y McKelvy 1981; Hayashi y Oshima 1977;

Gorenstein y Snyder, 1979; Malfroy y col., 1978; Della Bella y col., 1979). La actividad de estas enzimas puede ser inhibida por varias sustancias, por ejemplo puromicina y bestatina (Hayashi y Oshima 1977), la bacitracina (Traficante y col., 1980) la amastatina y los reactivos sulfidrilo (Barclay y Phillips, 1980).

Otras enzimas son las dipeptidil aminopeptidasas. Dentro de este grupo se encuentran la encefalinasasa A y la ACE - enzima convertidora de la angiotensina-. Inicialmente se consideró a la encefalinasasa A como una enzima específica de estos péptidos debido a que su distribución regional en el cerebro (Della Baume y col., 1981) coincide con la de las encefalinas y los receptores opiáceos (Malfroy y col., 1979). Además, se creía que sólo se producía en el cerebro, sin embargo, pronto fue localizada en pulmones, riñon, glándulas salivales y testiculos de rata, donde presenta alta actividad.

Como la ACE, la encefalinasasa también es una metaloproteínasa y ambas rompen la unión Gli-Fen. Aunque en un tiempo se creyó que ambas enzimas eran la misma, actualmente se sabe que presentan una distribución regional diferente, su especificidad hacia sus sustratos no es la misma y el efecto de los inhibidores no es igual. Así el captopril es 1000 veces más potente para la ACE que para la encefalinasasa y el tienfan es 50 veces más potente para la encefalinasasa que para la ACE (Roques y col., 1980).

Se ha reportado que otras dos enzimas degradan a las encefalinas: la carboxipeptidasa A, la cual rompe el enlace

péptidico carboxilo terminal (Della Bella y col., 1979) y otra enzima designada como encefalinasa B, la cual hidroliza la unión gli-gli de las encefalinas (Gorenstein y Snyder, 1979). Esta última enzima no ha sido bien caracterizada.

CAPITULO 3

ENCEFALINAS Y EPILEPSIA

Varias neurotransmisores y neuromoduladores han sido implicados en los mecanismos que subyacen al kindling. La mayoría de las evidencias han sido obtenidas mediante experimentos electrofisiológicos, farmacológicos y bioquímicos que han mostrado cambios ya sea en la concentración de los transmisores, síntesis ó recambio, modificaciones en el número ó afinidad de receptores ó alteraciones en la respuesta sináptica. En este capítulo se describen los trabajos farmacológicos y bioquímicos que muestran la participación de los opioides endógenos en el kindling y en otros modelos experimentales de epilepsia.

Hace 130 años Cogswell (1852) observó el efecto convulsivante de la morfina en la rana. A partir de este estudio varios trabajos han propuesto que los agonistas opiáceos se comportaban como agentes convulsivantes ó anticonvulsivantes (Frenk 1983). Se ha sugerido que ambos efectos (pro y anti-epilépticos) estarían mediados por receptores opiáceos específicos e incluso, por una acción inespecífica sobre el sistema GABAérgico.

1) Farmacología

Las evidencias farmacológicas que muestran que los péptidos opioides participan en los procesos epilépticos, fueron presentadas por varios trabajos en que se reporta que la

administración intracerebroventricular (ICV) de metionina encefalina (Urca y col., 1977; Frenk y col., 1978), Leucina encefalina (Frenk y col., 1978; Snead y col., 1980; 1982), D-ala-metionina-encefalina (Tortella y col., 1978; 1981; Frenk y col., 1984), D-ala-leucina encefalina (DALE) (Tortella y col., 1981), B-endorfina (Henriksen y col., 1978; Snead y col., 1982) y morfina (Urca y col., 1977; Frenk y col., 1978; Frenk 1983; Tortella y col., 1978; Snead y col., 1982), producen alteraciones electroencefalográficas (EEG) características de la actividad epiléptica, las cuales van acompañadas por conductas tales como catatonía, sacudidas de perro mojado y movimientos mioclónicos.

Estos mismos efectos se han observado al administrar estas sustancias en hipocampo (Elazar y col., 1979; Sprick y col., 1981), núcleo dorsomedial del tálamo (Frenk y col., 1978), núcleo caudado (Neal y Keane, 1978). Los efectos epilépticos producidos por todas estas sustancias pueden ser total ó parcialmente antagonizados mediante la administración sistémica de naloxona (Frenk y col., 1978; Tortella y col., 1978).

Cain y Corcoran (1984, 1985), lograron producir un efecto kindling aplicando inyecciones locales repetidas de metionina encefalina y B-endorfina en la amígdala posterior y el hipocampo ventral en dosis subconvulsivas. La inyección de morfina sin embargo produjo tolerancia. Todos estos efectos fueron antagonizados con naloxona aplicada intraperitonealmente.

Así mismo Ikonomidou-Turski y col. (1987), encontraron que la microinyección de morfina en dosis bajas (25-50 nmol) en

La amígdala de la rata, produce automatismos gustatorios y sacudidas de perro mojado (wet-dog-shakes) y a dosis altas crisis motoras y status epilepticus así como daño tisular relacionado con las crisis en varias estructuras cerebrales. La microinyección en amígdala de D-Ala, D-Leu-encefalina (DALE) (sustancia análoga de la leu-encefalina protegida de la acción enzimática) tiene efectos similares a los de la morfina a dosis bajas, sin embargo la naloxona bloquea la acción de DALE, pero no de la morfina. Así mismo el diazepam inhibe la acción convulsivante de la morfina, DALE y naloxona.

2) Efecto de opiáceos y opioides en el proceso del kindling

Frenk y col., (1979), propusieron que los opioides endógenos pueden actuar como sustancias inhibidoras al ser liberadas durante las crisis convulsivas. Esta hipótesis ha sido probada mediante experimentos farmacológicos utilizando agonistas y antagonistas de los receptores opioides.

Los efectos más característicos de la morfina administrada sistémicamente en el kindling son la prolongación de la conducta postictal y la depresión electroencefalográfica así como el incremento en la frecuencia de las espigas interictales y postictales, sin embargo a esta dosis la morfina no llega a producir ningún efecto en la velocidad del desarrollo del kindling ó en la expresión de las crisis generalizadas. (Albertson y col., 1984; Frenk y col., 1979; Hardy y col., 1980; Le Gal La Salle y col 1977; Stone y col., 1982). Estos trabajos muestran que los opioides endógenos pueden ser liberados durante las crisis convulsivas (fase 5) y sean responsables de los efectos

postictales.

En cuanto al desarrollo del kindling, algunos autores (Post y col., 1979) han mostrado que la morfina y la naloxona no alteran la duración de las posdescargas; sin embargo otros encontraron que la naloxona aumenta la velocidad del kindling amigdalino (Hardy y col., 1980).

3) Bioquímica

Vindrola y col. (1981a), encontraron que los niveles de metionina y leucina encefalina se incrementan 28 horas después de producirse crisis generalizadas repetidas (cinco ó más) en ratas con kindling eléctrico amigdalino. Posteriormente cuantificaron ambos pentapéptidos durante el desarrollo del kindling, encontrando que la leu-encefalina se incrementa progresivamente, lo cual sugiere que este péptido está correlacionado con la duración de la posdescarga y con las etapas conductuales, mientras que la metionina encefalina aumenta como consecuencia de varias crisis generalizadas (Vindrola y col. 1981b)

El kindling puede ser inducido también con sustancias químicas administradas localmente tales como la carbamilcolina, la penicilina y otras sustancias. Así mismo, por la administración sistémica de cocaína, pentilentetrazol y ácido kainico (Vosu y Wise, 1975; Collins, 1978; Post y Kopanda 1976; Pinel y Vant Ott, 1975; Ito y col., 1977).

Utilizando el modelo del kindling químico con pentilentetrazol Vindrola y col. (1983), reportaron que ambas

encefalinas se incrementan en el estriado, el septum y la amígdala 24 horas después que los animales presentaron la quinta crisis generalizada.

Con el objeto de probar si los cambios producidos por el kindling farmacológico con pentilentetrazol (PTZ) se deben a un efecto de crisis repetidas generalizadas ó a un cambio permanente, se cuantificaron los niveles de encefalinas en amígdala, hipotálamo, estriado, septum e hipocampo 16 días después de que los animales habían presentado la última crisis, encontrando, que los niveles de metionina encefalina permanecieron elevados en casi todas las estructuras probadas a excepción del estriado, en el cual los niveles regresaron a valores control. Con respecto a la leucina encefalina se encontró que en todas las estructuras, los valores regresaron a niveles control. Lo anterior sugiere que la metionina encefalina está relacionada a cambios duraderos de la función cerebral inducidos por este modelo, mientras que los cambios para la leucina encefalina están asociados a las posdescargas y al desarrollo de las etapas conductuales (Vindrola y col., 1984).

McGinty y col. (1986), reportaron que los niveles de inmunoreactividad (IR) a la metionina encefalina se incrementaron en un 43 % en el hipocampo de ratas sacrificadas 24 horas después de producirse 2 crisis generalizadas. Sin embargo, en el hipotálamo, en el estriado, en la corteza frontal, así como en cerebro medio no detectaron modificaciones. Además, determinaron que 28 días después de haberse producido el kindling amigdalino, la metionina encefalina había regresado a valores control.

Naranjo, Iadarola y Costa (1986) describieron que durante el desarrollo del kindling eléctrico amigdalino en la rata, hay incremento del mRNA para la Preproencefalina A, así como del octapéptido Met-enkefalina-Arg-Gli-Leu en el hipocampo, amígdala, corteza entorrinal y núcleo acumbens.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las evidencias mostradas en los párrafos anteriores indican que las encefalinas participan en los mecanismos de neurotransmisión que subyacen al fenómeno epiléptico. Si bien su papel funcional como activadores ó inhibidores ó bien como moduladores de las crisis no ha sido bien esclarecido, existen evidencias sobre cambios en la concentración de estos péptidos en cerebro total y en algunas estructuras del sistema nervioso central (Vindrola y col. 1981a y b; McGinty y col., 1986).

También se ha reportado incremento en la biosíntesis de Preproencefalina A mediante la determinación del mRNA que codifica para esta proteína en estructuras como amígdala, hipocampo, corteza entorrinal y frontal.

Sin embargo, es necesario efectuar un estudio regional que permita analizar en forma conjunta, los cambios en la concentración de Metionina y Leucina-encefalina en varias estructuras cerebrales principalmente límbicas en el desarrollo y la consolidación del kindling eléctrico amígdalino. Así mismo, es importante saber si estos cambios son transitorios ó permanentes.

El interés por analizar las modificaciones regionales obedece principalmente a que 1) las estructuras cerebrales responden en forma diferente (suceptibilidad) al efecto kindling y 2) que los tres sistemas opioides y sus diferentes receptores están distribuidos amplia y diferencialmente en el SNC, debido a lo cual la expresión de cambios en la concentración de péptidos

opioides a nivel regional podrá depender de la susceptibilidad de los sistemas opioides para responder a la epileptogénesis, así como de la susceptibilidad de cada estructura durante la evolución, instauración (primera y crisis repetidas) y la posibilidad de que los cambios sean permanentes.

H I P O T E S I S

Los cambios regionales en las concentraciones de los péptidos opioides metionina y leucina-encefalina, van a depender de la estructura analizada, ya que no todas las regiones cerebrales muestran la misma respuesta al kindling y la distribución regional de la familia de péptidos opioides en el cerebro es diferente.

O B J E T I V O S

Conocer los cambios que se producen en la concentración de metionina y leucina-encefalina en estriado, amígdala, hipotálamo, hipocampo, cerebro medio, corteza cerebral y médula espinal en las siguientes condiciones experimentales:

1. Control
2. Operado no estimulado
3. Durante el desarrollo del kindling (estadio II - III)
4. Primera crisis convulsiva generalizada (1CCG)
5. En el kindling establecido (10 CCG)
6. Permanencia (21 días después de la última estimulación de un grupo que presentó al menos 10 CCG.

M A T E R I A L Y M E T O D O

1) Sujetos Experimentales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 250 a 300 g de peso, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y luz (23 ± 1 C, con 12 horas de iluminación, comenzando a las 6.00 hr), con agua y alimento ad libitum.

2) Grupos Experimentales

Para su estudio los animales estuvieron divididos en 6 grupos:

1o Grupo Control (CO): 50 ratas macho que no recibieron ningún tratamiento.

2o Grupo Falso Operado: 10 ratas que fueron implantadas crónicamente en la amígdala izquierda. Este grupo no recibió ninguna estimulación eléctrica.

3o Grupo Durante el Desarrollo del Kindling (fase 2 -3)
Este grupo de 10 ratas fué implantado como el anterior y se estimuló la amígdala izquierda hasta llegar al estadio 2-3 descrito por Racine (1972 b).

4o Grupo Primera Crisis Generalizada (1CG), 10 ratas implantadas que se estimularon hasta presentar la primera crisis generalizada (fase 5).

5o Grupo Diez Crisis Generalizadas (10CG), diez ratas fueron implantadas y se les estimuló hasta presentar al menos diez crisis motoras

generalizadas (fase 5).

6o Grupo Permanencia (PERM), fué implantado y estimulado al igual que el grupo 10G5, pero que se sacrificó 21 días después de haber presentado la décima crisis generalizada.

Los grupos 2-3, 1CG y 10CG se sacrificaron 24 horas después de haber recibido la última estimulación amigdalina.

3) Procedimiento quirúrgico

Las intervenciones quirúrgicas para la implantación del electrodo de estimulación y registro se llevaron a cabo anestesiando a los animales con una dosis de pentobarbital sódico de 40 mg/kg de peso. Una vez anestesiada la rata se colocó en el estereotáxico y se le implantó en amígdala izquierda un electrodo bipolar concéntrico de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas de Albe-Fessard y col. (1966), (anterior 5.8; lateral 4.5; altura 2.5). La colocación del electrodo se llevó a cabo con la ayuda del registro de la actividad eléctrica bajo el criterio de la actividad espontánea y de los potenciales evocados a la estimulación olfativa y somato sensorial. Los electrodos y el conector se fijaron en el cráneo por medio de dos tornillos embebidos en acrílico dental. Una vez terminada la implantación, los animales fueron sometidos a un periodo de recuperación quirúrgica de una semana. Durante la fase de estandarización de esta técnica de implantación algunos de los animales fueron seleccionados al azar para verificar la ubicación del electrodo en el núcleo central de la amígdala. Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico y

perfundidos por via cardiaca, inicialmente con solucion salina al 5% e inmediatamente despues con una solucion al 10% de formol. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se colocaron en formol al 20% durante un periodo no menor de 15 dias, para despues ser analizados mediante cortes histologicos coronales de 50 micras, que se utilizaron como negativos para impresiones en papel fotografico (Guzman y col., 1958).

4) Estimulación amigdalina

Una vez terminado el período de recuperación, se inició el kindling amigdalino. Los parámetros de estimulación utilizados fueron los siguientes: un tren de un segundo de duración, constituido por pulsos rectangulares de 1 mseg a una frecuencia de 60 Hz. La intensidad de los estímulos se determinó a partir del umbral a la posdescarga* y fué entre 70 y 150 A.

La búsqueda de esta intensidad umbral se llevó a cabo aplicando estímulos de intensidad creciente a intervalos de 5 minutos. La estimulación inicial fué de 70 A, la cual fué incrementandose de 10 A en 10 A, hasta producir una breve posdescarga de varios segundos constituida por 5 a 10 espigas de alto voltaje y acompañada por la conducta característica de cierre del ojo ipsilateral.

La actividad neuronal fué amplificada, monitoreada en el osciloscopio y fotografiada para medir la duración de la posdescarga.

* El umbral a la posdescarga amigdalina es definido como la intensidad mínima de estimulación, que puede provocar una posdescarga en la estructura cerebral estimulada y cambios conductuales que pueden ser: inmovil, giro, cierre del ojo.

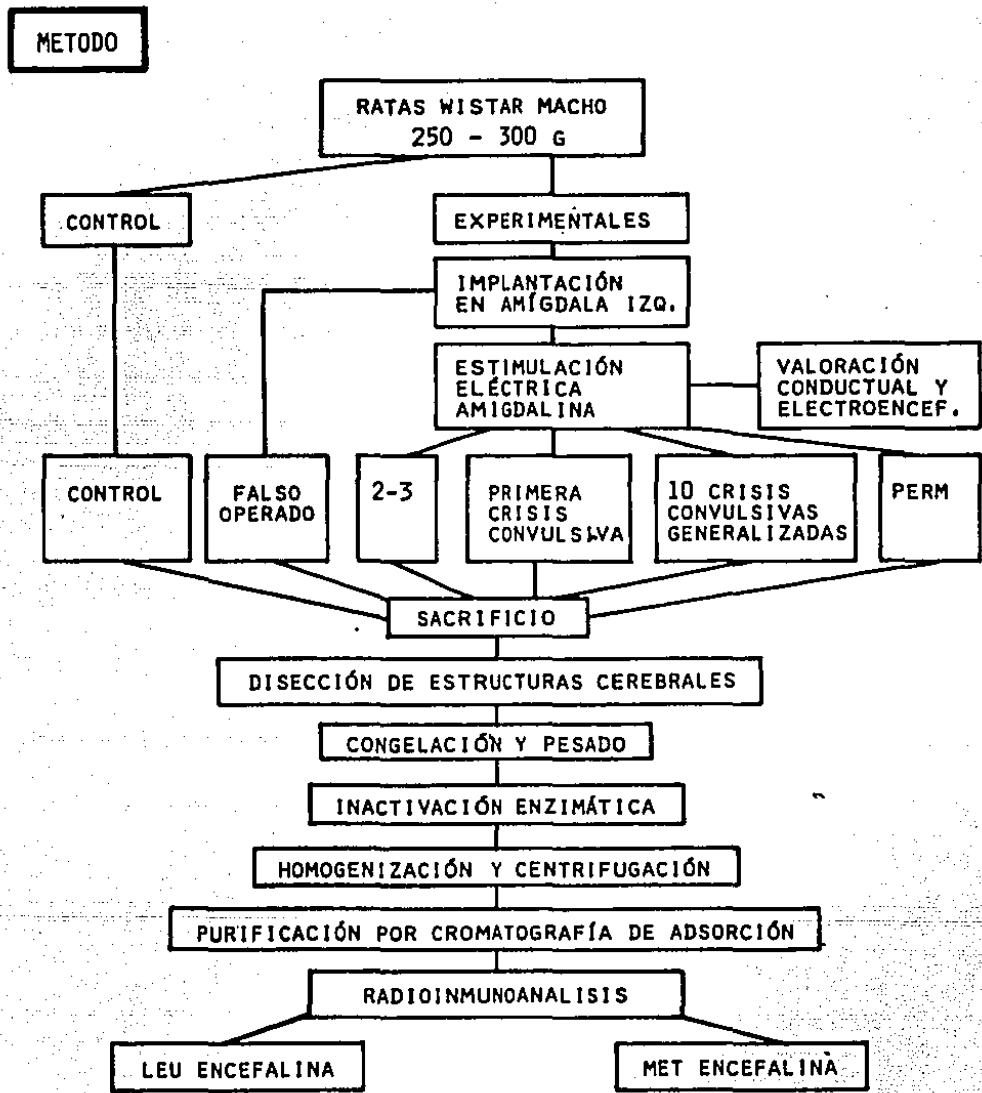


FIG.5 Secuencia Metodológica a lo largo del desarrollo Experimental.

La estimulación amigdalina se llevó a cabo dos veces al día; a las 9.00 y a las 15.00 horas, cinco días a la semana.

La evolución del kindling se evaluó por la duración de las posdescargas y por la conducta de los animales tomando como referencia los criterios definidos por Racine (1972b). Asimismo, se cuantificó el número de estímulos necesarios para provocar los diferentes estadios conductuales, así como la primera crisis generalizada.

La duración de la posdescarga (PD) dada en segundos, así como los diferentes estadios conductuales presentados en cada estimulación fueron promediados para cada grupo experimental.

5) Sacrificio y Disección

Los grupos 2-3, 1CG y 10CG se sacrificaron 24 horas después de la última estimulación e inmediatamente después se efectuó la disección de las siguientes estructuras cerebrales (en el caso de ser estructuras par se disecaron ambas): estriado, hipocampo, hipotálamo, cerebro medio y corteza, por el método de Glowinski e Iversen (1966), con algunas modificaciones (Vindrola y col., 1983). También se disecaron ambas amígdalas por el procedimiento de Engel y Sharpless (1977). La disección de la médula espinal se efectuó a nivel del plexo braquial.

6) Extracción de encefalinas del tejido cerebral

Una vez disecadas las estructuras se colocaron en una plancha de hielo seco para posteriormente ser pesadas. Después cada una de las estructuras fue incubada en 6 volúmenes de HCl 0.1 N a 95 C durante 15 min. Este último paso se realizó con el

objeto de inactivar a las enzimas responsables del catabolismo de las encefalinas. Inmediatamente después las muestras fueron enfriadas colocándolas en hielo y se guardaron en congelación. El proceso de purificación continuó con la homogenización y posterior centrifugación de las estructuras cerebrales a 20,000 rpm durante una hora, a 2°C. El sobrenadante ácido fué separado para luego ser purificado.

7) Purificación por cromatografía de adsorción

El sobrenadante se purificó por cromatografía de adsorción utilizando la resina Amberlita XAD-2 previamente activada. La activación se efectuó por tratamiento sucesivo con tres ciclos de tres volúmenes de cada uno de los siguientes solventes: acetona-metanol-agua. Luego se prepararon columnas de 8 x 0.7 cm., llenándolas con amberlita y se reguló la velocidad de flujo a 0.5 ml/ min.

Los sobrenadantes ácidos de los extractos de tejido, se aplicaron a la columna, se lavó con 20 ml de ácido clorhídrico 0.1N y 40 ml de agua. Los péptidos se eluyeron con 20 ml de metanol (la recuperación de la met-encefalina y la leu-encefalina marcados con tritio agregados a un extracto de tejido fué superior al 90 %). Los eluatos con metanol se recolectaron en tubos siliconizados y se evaporaron a 40°C bajo corriente de aire. Luego se resuspendieron en agua destilada y se congelaron a -20°C hasta el momento de la cuantificación.

8) Cuantificación de encefalinas por Radioinmunoanálisis

Los radioinmunoanálisis se llevaron a cabo en amortiguador de fosfatos a 20 mM conteniendo 0.9% de NaCl, 0.01% de gelatina y 0.02% de azida sódica. El volumen final fué de 350 ml y la separación de los péptidos unidos al anticuerpo del libre se realizó mediante la adición de una solución de carbón activado al 1.25 % con 0.125% de destrán y posterior centrifugación durante 30 min a 4 C a 3000 rpm. Los períodos de incubación de la mezcla: estandar frío, estandar marcado y antisuero fueron de 16 a 24 horas a 4°C. Los antisueros que se emplearon fueron el de Met-encefalina que mostró 100% de reactividad cruzada con Met-(o)-encefalina, 0.3% con Leu-encefalina, 0.2% con el heptapéptido Me-Arg-Phe y menos del 0.01% con ME-Arg, dinorfina-(1-13), dinorfina-(1-8), ME-Arg-Fen-Leu, alfa, gamma y beta-endorfina.

El antisuero de leu-encefalina presentó reactividad cruzada con Leu-encefalina de 100% con Met-encefalina de 3.83%, de 4.33%; con LE-Arg, de 0.53% con ME-Arg, de 0.37% con el heptapéptido, Met-(O)-encefalina, octapéptido ME-Arg-Fen-Leu y dinorfina-(1-8). La reactividad cruzada con alfa, gamma y beta-endorfina fué insignificante.

9) Análisis Estadísticos

La evolución del kindling se evaluó mediante el desarrollo de la posdescarga, para lo cual se midió su duración en segundos, durante cada estimulación (K1-K25) en cada uno de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales. Los valores fueron promediados y graficados por

grupo. Así mismo los cambios conductuales se evaluaron de acuerdo a la clasificación de Racine (1972b).

La concentración de IR-Met e IR-Leu-encefalina fué determinada para cada grupo experimental. Con los resultados obtenidos se efectuó un Análisis de Varianza para determinar la significancia estadística entre todos los grupos (control, falso operado, 2-3, 1CG, 10CG y PERM), para cada estructura y para cada péptido. Cuando se encontró una diferencia significativa (DVS Prueba de Tukey), se efectuó la prueba de t'student.

CAPITULO V

R E S U L T A D O S

1) Desarrollo del Kindling Amigdalino

La evolucion del kindling se evaluo mediante el desarrollo de la posdescarga, para lo cual se midio su duracion en segundos, durante cada estimulacion (K1 - K25) en cada uno de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales. Los valores fueron promediados y graficados por grupo. Asi mismo los cambios conductuales se evaluaron de acuerdo a la clasificacion de Racine (1972b).

En la figura 6A se muestra la evolucion de la posdescarga durante el proceso del kindling amigdalino. El grupo 2-3 el cual fue estimulado por 5 ocaciones, presento una posdescarga cuya duracion fue de 37.75 ± 8.78 segundos ($X +$ error estandar). El grupo 10G que se estimulo hasta producir la primera crisis generalizada (K15) tuvo una posdescarga cuya duracion fue de 55.33 ± 6.14 segundos. Para el grupo 10CG la posdescarga tuvo una duracion de $80 + 11.36$ seg. Y por ultimo la duracion promedio de la posdescarga del grupo PERM fue de 97.25 ± 7.67 segundos despues de la estimulacion 24.

Estos dos ultimos grupos, el 10CG y el PERM alcanzaron la decima crisis convulsiva generalizada despues de 22 ± 2 estimulaciones. Sin embargo la estimulacion se continuo hasta la numero 25.

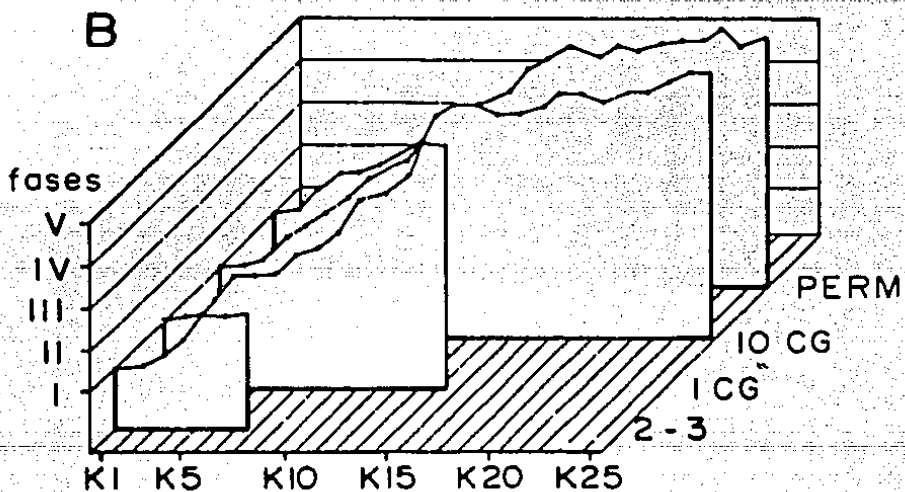
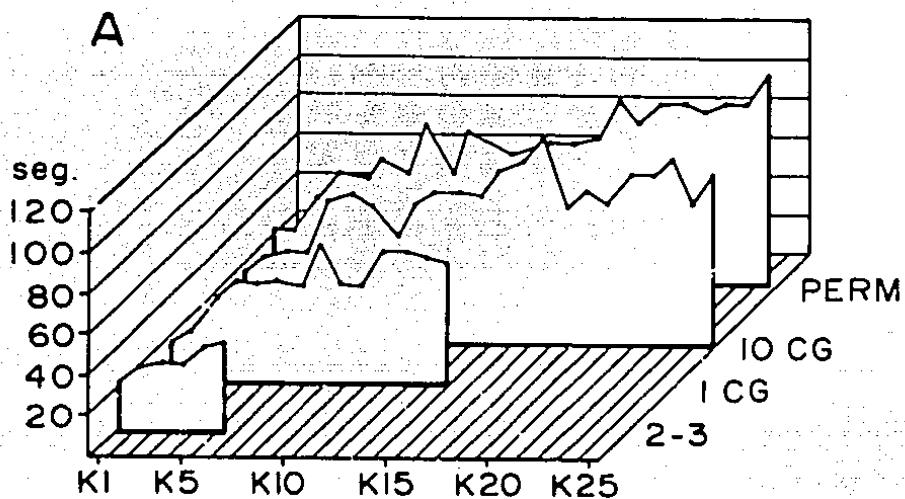


Figura 6. Muestra la duración de la posdescarga (A) y la evolución de las etapas conductuales (B) durante el proceso del kindling, en los diferentes grupos experimentales (2-3, 1CG, 10CG, PERM). Observe el incremento continuo de la duración de la PD (seg) después de la primera crisis generalizada en K15. Las abscisas: - indican el número de estimulaciones.

En la figura 6B se puede observar el desarrollo progresivo de la conducta. La fase 2-3 del kindling fué alcanzada por todos los grupos entre la quinta y la séptima estimulación amigdalina. Asimismo, se observó que la fase 5, es decir, cuando se presenta la primera crisis convulsiva generalizada, se alcanza entre la estimulación 14 y 15. Los grupos 10 CG y PERM fueron estimulados hasta el K25 y se pudo observar un incremento progresivo en la intensidad y duración de las crisis generalizadas repetidas.

También se observaron crisis electroencefalográficas recurrentes como se muestra en la Fig. 7. Esto es, las crisis convulsivas generalizadas fueron progresivamente más intensas, hasta que después de al menos 5 crisis, los animales presentaron una conducta de saltos similar a la que describe Joy (1985), en su clasificación del estadio VII del kindling (ver cuadro II).

Esta conducta convulsiva así como las "sacudidas de perro mojado" (wet-dog-shakes) no se observaron en todos los animales y su presentación fué variable. La presencia de WDS estuvo frecuentemente asociada con la parte final de las crisis motoras generalizadas.

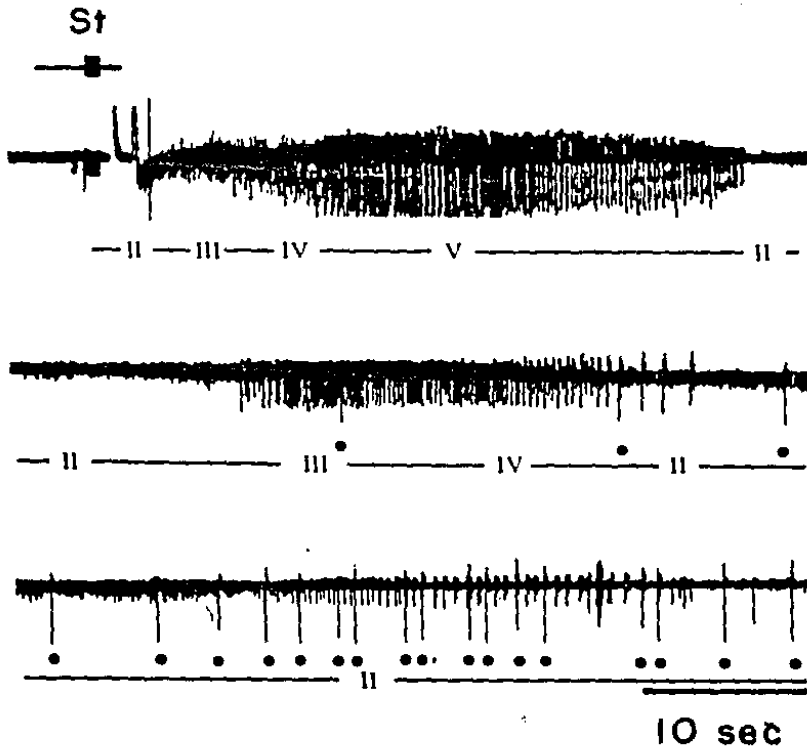


Figura 7 . Registro electrográfico de la posdescarga en la amígdala de una rata del grupo 10CG. El registro corresponde a la estimulación amígdalina 20 y a la fase V del kindling. La crisis electroencefalográfica estuvo acompañada por una crisis motora bilateral generalizada. El primer trazo muestra la actividad basal, el artefacto del estímulo y la PD. El segundo trazo muestra una crisis recurrente electroencefalográfica acompañada por conductas estereotipadas y "wet-dog-shakes". El tercer trazo muestra otra crisis electroencefalográfica recurrente, menos intensa y wet-dog-shakes. St: artefacto del estímulo; (•): corresponde a los "wet-dog-shakes"; el número se refiere a las etapas conductuales descritas por Racine(1978b). La etapa II incluye automatismos.

2) Cuantificación Regional

La concentración de IR-Met e IR-Leu-encefalina fue determinada para cada grupo experimental y comparado con su respectivo grupo control. Con los resultados obtenidos se efectuó un análisis de varianza para determinar la significancia estadística entre todos los grupos (control, falso operado, fase 2-3, 1CG, 10CG y PERM), para cada estructura y para cada péptido. Los resultados se muestran en la Tabla III.

TABLA III

ESTRUCTURA	IR-MET-ENCEFALINA	IR-LEU-ENCEFALINA
ESTRIADO	F 3.02 P <0.013	F 1.1118 P <0.361
AMIGDALA	F 52.9998 P <0.000 *	F 41.7735 P <0.000 *
HIPOTALAMO	F 2.665 P <0.031	F 1.1922 P <0.323
TALLO CEREBRAL	F 0.899 P <0.487	F 15.2668 P <0.000 *
HIPOCAMPO	F 8.435 P <0.000 *	F 9.7330 P <0.000 *
CEREBRO MEDIO	F 0.841 P <0.528	F 5.5777 P <0.000 *
MEDULA ESPINAL	F 5.017 P <0.007 *	F 2.7846 P <0.060
CORTEZA	F 2.155 P <0.106	F 2.2862 P <0.096

Cuando se encontraron valores significativos al efectuar el análisis de varianza para una determinada estructura y péptido se aplicó entonces, la prueba de "t" de Student. Debido a que los valores obtenidos para el grupo control y el grupo falso operado no resultaron ser significativamente diferentes se utilizó el grupo control para establecer la diferencia.

a) IR-Met-encefalina

TABLA IV

IR-METIONINA-ENCEFALINA (Pmol/g) EN EL CEREBRO DE RATA DURANTE EL KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO

ESTRUCTURA	CONTROL	FALSO OPERADO	2 - 3	1CG	10 CG	PBRM
ESTRIADO	2013 ± 82	2144 ± 101	1860 ± 109	2047 ± 150	1524 ± 82**	1502 ± 127*
AMIGDALA	329 ± 12	397 ± 48	526 ± 23 *	1036 ± 87*	812 ± 64 *	411 ± 43 ***
HIPOTALAMO	718 ± 27	782 ± 84	752 ± 54	757 ± 55	926 ± 69 *	694 ± 42
TALLO CEREBRAL	331 ± 8	285 ± 8	251 ± 7 **	302 ± 8	280 ± 9	279 ± 7 **
HIPOCAMPO	100 ± 4	93 ± 6	96 ± 7	120 ± 8	152 ± 15 *	80 ± 5
CEREBRO MEDIO	330 ± 22	361 ± 37	379 ± 22	310 ± 17	323 ± 17	301 ± 27
CORTEZA	92 ± 7	80 ± 5	-----	131 ± 13 ***	127 ± 13***	-----
MEDULA ESPINAL	144 ± 7	139 ± 12	-----	126 ± 2	127 ± 8	171 ± 19

Cada valor es la media ± error standar obtenido por estructura para cada grupo experimental. Los niveles de significancia se calcularon utilizando la prueba "t" de Student: *p<0.003, ** P<0.008, ***p<0.02 comparado con el grupo control. (--) no cuantificado.

La concentración de IR-Met-encefalina se modificó significativamente en varias estructuras cerebrales (Tablas III y IV). Es así que en amígdala se incrementa en forma gradual en los grupos 2-3, 1CG y 10CG. Esta estructura es la única en la cual la concentración de ambos péptidos aumenta en todos los grupos experimentales. Y de la misma manera se observa que en el grupo PERM hay una tendencia a descender.

En hipotálamo y en hipocampo únicamente aumenta la concentración de este péptido en el grupo que presentó diez crisis convulsivas generalizadas.

También se encontró que la IR-Met-encefalina también baja en su concentración en el estriado en los grupos 10CG y PERM. Así como en el tallo cerebral donde se observa un descenso general en todos los grupos pero sólo es significativo durante el desarrollo (fase 2-3) y en el grupo PERM.

TABLA V

IR-LEUCINA-ENCEFALINA (Pmo1/g) EN EL CEREBRO DE RATA DURANTE EL KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO

ESTRUCTURA	CONTROL	FALSO OPERADO	2 - 3	1CG	10 CG	PERM
ESTRIADO	352 ± 15	415 ± 31	369 ± 18	335 ± 36	314 ± 28	328 ± 26
AMIGDALA	107 ± 3	100 ± 8	147 ± 7 *	164 ± 8 *	220 ± 12 *	146 ± 6 *
HIPOTALAMO	259 ± 7	234 ± 15	240 ± 14	273 ± 29	264 ± 18	224 ± 17
TALLO CEREBRAL	107 ± 6	111 ± 12	99 ± 3	50 ± 7 *	52 ± 6 *	65 ± 5 *
HIPOCAMPO	47 ± 4	46 ± 1	69 ± 3 *	81 ± 5 *	91 ± 9 *	64 ± 1 *
CEREBRO MEDIO	62 ± 2	58 ± 1	56 ± 2	48 ± 3 ***	63 ± 3	42 ± 3 *
CORTEZA	25 ± 2	24 ± 2	-----	18 ± 2 ***	25 ± 1	-----
MEDULA ESPINAL	58 ± 3	67 ± 7	49 ± 4	-----	-----	67 ± 8

Cada valor es la media ± error standar obtenido por estructura para cada grupo experimental. Los niveles de significancia se calcularon utilizando la prueba "t" de Student: * p<0.003, *** p<0.02 comparado con el grupo control. (-) no cuantificado.

b) IR-Leu-Encefalina

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la cuantificación de este péptido (Tablas III y V), mostró que en la amígdala y en el hipocampo se producen incrementos significativos en los grupos 2-3, 1CG, 10CG y PERM con respecto al grupo control. Este incremento es progresivo en los tres primeros grupos experimentales y en el grupo PERM, -el cual fué sacrificado 21 días después de la última estimulación- se observa una tendencia a disminuir.

En la figura 8 se pueden observar los cambios progresivos que se producen en el estriado y en la amígdala en los diferentes grupos experimentales (2-3, 1CG, 10CG). Asimismo se puede observar una tendencia a valores control en el grupo PERM.

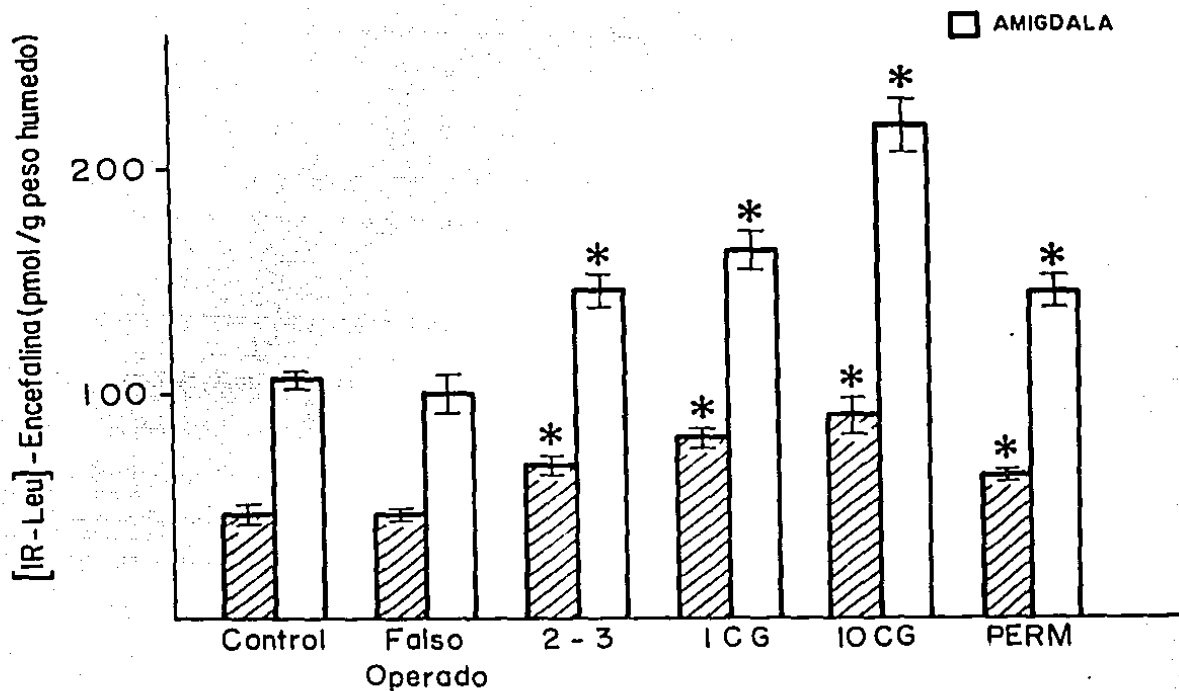


Figura 8. Muestra el incremento progresivo de la concentración de Leu-enkefalina en la amígdala y en el hipocampo en los diferentes grupos experimentales. Los niveles de significancia se calcularon utilizando la prueba "t" de Student: * $p < 0.003$.

En el tallo cerebral la concentración de Leu-enkefalina descendió significativamente, dicho efecto se mantuvo constante en los grupos 1CG, 10CG y PERM. Así mismo, en el cerebro medio, los niveles descendieron en los grupos 1CG y PERM y en la corteza cerebral, este efecto se observó en el grupo 1CG. El estriado, el hipotálamo y la médula espinal no presentaron modificaciones.

DISCUSION

Como modelo experimental de epilepsia, el kindling nos permitió observar en distintos grupos la evolución conductual, electroencefalográfica y bioquímica de las diferentes etapas epilépticas.

Los grupos experimentales en los cuales se llevó a cabo el kindling amigdalino mostraron una evolución gradual y progresiva tanto en la conducta como en el desarrollo de las posdescargas. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por otros autores (Racine, 1972b; Racine y col., 1973; Albright y col., 1979). Sin embargo es interesante señalar que no todas las ratas presentaron en el mismo número de estimulaciones la primera crisis generalizada. Esto puede deberse a pequeñas diferencias en la localización del electrodo dentro del complejo amigdalino. Le Galle la Salle (1981), encontro que en el núcleo central de la amígdala el kindling se desarrolla mas rápido que en los núcleos lateral, basal o medial. Asimismo, Cain y Concoran (1984) reportaron que en amígdala anterior, el kindling se produce más rápidamente que en amígdala posterior. De cualquier manera, los grupos experimentales fueron cuidadosamente seleccionados para obtener grupos homogéneos en sus características epilépticas.

Los animales pertenecientes a los grupos 10CG y PERM, que fueron estimulados hasta producirse 10 ó más crisis generalizadas, presentaron las siguientes conductas: caídas

repetidas, clonus de miembros posteriores y saltos, que fueron de mayor intensidad a lo largo de las crisis sucesivas. Estas conductas han sido clasificadas por Joy (1985), dentro de la fase VI y VII del kindling (Ver cuadro II). Lo cual indica que el fenómeno de epileptización continúa después de la primera crisis generalizada. Debido a que estas características conductuales no fueron un patrón común en todos los animales se optó por seguir la clasificación de Racine, (1972b).

La cuantificación de Metionina y Leucina-encefalina mostro que el kindling eléctrico amigdalino produce cambios regionales en la concentración de cada uno de estos péptidos, dichos cambios están relacionados con el desarrollo y la consolidación del fenómeno epiléptico, además son de larga duración (21 días grupo PERM). Estas modificaciones muestran que existe una independencia funcional de cada péptido relacionada a los diferentes estadios epilépticos.

La cuantificación de Leu-encefalina mostro que en la amígdala y en el hipocampo, este péptido aumenta en forma gradual en los grupos 2-3, 10G y 10CG, esto es, durante las fases de desarrollo, en la primera crisis y en las crisis repetidas. En el grupo PERM se observa que a pesar de que la concentración es significativamente alta con respecto al control sus valores han comenzado a descender. Estos resultados coinciden con los descritos por Vindrola y col. (1981b), quienes mostraron que la Leu-encefalina aumenta progresivamente en los hemisferios cerebrales de la rata, durante el desarrollo del kindling.

La concentración de la IR-Met-encefalina en amígdala aumentó en todos los grupos experimentales que fueron

estimulados sin embargo, en el hipocampo y en el hipotálamo sólo se incrementa este péptido, después de varias crisis convulsivas generalizadas. Estos resultados también coinciden con los descritos por el grupo de Vindrola (1981b), quienes encontraron que la concentración de Met-enkefalina se modifica como consecuencia de las crisis convulsivas generalizadas en cerebro total. Nuestros resultados mostraron además que la concentración de este péptido se incrementa desde la fase 2-3 del kindling lo cual da evidencia de que la Met-enkefalina está involucrada también en la etapa del desarrollo del kindling y no solo en las crisis generalizadas.

McGinty y col. (1986), utilizando el kindling amigdalino en la rata reportaron un incremento de Met-enkefalina del 43% en hipocampo, 24 horas después de haber presentado dos crisis consecutivas (fase V). Además analizaron hipotálamo, estriado, corteza frontal e hipocampo, un día después de la fase III y 28 días después, de la última crisis fase V, pero no encontraron cambios significativos.

Nuestros resultados en hipocampo para Met-enkefalina también muestran un incremento del 20% en la concentración de este péptido, pero dicho valor no llega a ser significativo con respecto al control. Sin embargo en el grupo 1065 observamos un incremento del 52% en la concentración de este péptido, el cual muestra un valor significativo de $P < 0.003$ con respecto al valor control. Este efecto pudo ser debido a un cambio progresivo en la concentración durante las crisis consecutivas.

Estos mismos autores encontraron que la Metionina-encefalina en hipocampo 28 días después de la última crisis (fase V), regresó a los valores control. Nuestros resultados para este péptido en el hipocampo pero cuantificados 21 días después de 10 crisis convulsivas generalizadas, mostraron valores significativamente altos con respecto al control pero con una tendencia a descender. Esta diferencia en los resultados puede deberse a los distintos días en los que se cuantificó dicho péptido y es posible que estos valores puedan reducirse entre el día 21 y 28. Por otro lado, los animales experimentales utilizados por McGinty y col., (1986) únicamente presentaron 2 crisis generalizadas y en nuestros experimentos se utilizaron animales que presentaron al menos 10 crisis. Es decir, que la duración de los incrementos en la concentración de la IR-Met-encefalina también son función del número de crisis que han presentado los animales de experimentación.

Estos datos indican que los incrementos en la concentración de encefalinas, en los animales sometidos al kindling amigdalino, ocurren, fundamentalmente en áreas del sistema límbico. Los decrementos en los niveles de las encefalinas (en el estriado, en el tallo cerebral, en el cerebro medio y en la corteza) podrían estar relacionados con estructuras cuya función es motora y de esta manera, contribuir a la expresión de las crisis generalizadas. Es decir, tendrían un efecto desinhibitorio.

Existen evidencias que muestran que el aumento en la concentración de Metionina y Leucina-encefalina en las diferentes

estructuras cerebrales puede deberse a un incremento en la biosíntesis de sus precursores.

Varios reportes en los cuales se han utilizado distintos modelos de crisis convulsivas, han mostrado que el mRNA para la preproencefalina A se incrementa. Algunos autores han propuesto que este incremento en la biosíntesis de las encefalinas, puede ser estimulado por una mayor actividad neuronal producida por las crisis recurrentes. (Yoshikawa y col., 1985; Kanamatsu y col., 1986; White y col., 1987; Naranjo y col., 1986).

Kanamatsu y col. (1986), encontraron que las crisis inducidas por la inyección intraestriatal de ácido kainico (1 microgramo/rata) causan alteraciones en la concentración de Met-enkefalina, en su precursor y en su RNA mensajero, estas alteraciones producen un incremento en la utilización hipocámpal de Met-enkefalina seguida por una sobreproducción de este péptido. Alteraciones similares fueron también observadas para la dinorfina 1-8.

La sobreproducción de encefalinas puede deberse también al procesamiento de péptidos de bajo peso molecular que pueden servir como precursores inmediatos. Zamir y col. (1984), han reportado que existe un procesamiento diferencial de prodinorfina en diferentes regiones cerebrales y que la Leu-enkefalina puede ser producida a partir de dinorfina A ó dinorfina B (ó ambas). Además de que puede derivar de los precursores prodinorfina y proencefalina. Estos autores hacen notar que los derivados de la prodinorfina son agonistas potentes

de los receptores kappa mientras que la leu-encefalina es un agonista potente de los receptores delta. Es así que el mismo precursor -prodinorfina- puede producir ligandos para diferentes subtipos de receptores que pueden ejercer acciones diferentes.

Otro trabajo que da evidencias sobre el procesamiento de péptidos de bajo peso molecular para producir encefalinas es el del grupo de Acker y col. (1989 87), quienes reportaron que la endopeptidasa 24.15 -unida a membranas sinaptosomales- hidroliza a algunos de los péptidos que contienen leu-encefalina derivados de la Prodinorfina como son la Dlinorfina 1-8, alfa-neoendorfina y beta-neoendorfina para generar leu-encefalina, así como al octapéptido Met-encefalina-Arg-Gly-Phe, que al ser hidrolizado genera Met-encefalina.

Todas estas evidencias nos muestran una estrecha relación entre los péptidos opioides y la epilepsia sin embargo, es importante hacer notar que su papel funcional va a depender de: 1) el tipo de procedimiento experimental utilizado para producir la epilepsia y la región, que en su caso, se estimule, 2) el área cerebral que se analiza -aunque como se puede observar en este trabajo van a estar involucradas estructuras del sistema límbico - 3) del tipo de moléculas precursoras que se produzcan en esa región y del procesamiento que sufran estas, 4) del tipo de péptidos que se libere y de la afinidad que tenga cada uno así como de la competencia que se establezca por el tipo de receptor que se encuentre en la post-sinapsis, lo cual va a determinar su función.

Finalmente, estos resultados sugieren una participación de las

encefalinas en el desarrollo y en la instalación del fenómeno epiléptico, así como en algunas etapas de las crisis convulsivas, además de mostrar un efecto regional y diferencial para cada péptido estudiado.

R E F E R E N C I A S

- Acker, G.R., Molineaux, C. and Orłowski, M., Synaptosomal membrane-bound form of endopeptidase 24.15 generates Leu-enkephalin from dynorphin 1-8, alpha y beta-neoendorfin and Met-enkephalin from Met-Arg-Gly-Leu, *Journal of Neurochemistry*, 48 (1987) pp. 284-292.
- Albe-Fessard, D., Stutinsky, F. and Libouban, S., *Atlas Stereotaxique du Diencephale du rat blanc*. CNRS, Paris, 1971.
- Albright, P.S., Burnham, W.M. and Okasaki, M., Effect of atropine sulfate on amygdaloid kindling in the rat., *Exp Neurol.*, 66 (1979) pp. 409-412.
- Barclay, R.K. and Phillips, M.A., Inhibition of enkephalin-degrading aminopeptidase activity., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 96 (1980) pp. 1732-1738.
- Baune de la, S., Patey, G. and Schwartz, J.C., Subcellular distribution of enkephalin dipeptidyl carboxipeptidase (enkephalinase) in rat brain., *Neuroscience*, 6 (1981) p. 315.
- Bayon, A., Rossier, J., Mauss, A., Bloom, F.E., Iversen, L.L., Ling, N. and Guillemin, R., In vitro release of 5-Methionine-enkephalin and 5-Leucine-enkephalin from the rat globus pallidus., *Proc Natl Acad Sci*, 75 (1978) pp. 3503-3506.
- Bonnet, K.A., Grotin, J., Gioamini, T., Cortes, M. and Simon, E.J., Opiate receptor heterogeneity in human brain regions., *Brain Res*, 221 (1981) pp. 437-40.
- Brailowsky, S., Siva-Barrat, C. and Naquet, R., Elementos fisiopatologicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigacion experimental., *Salud Mental*, 12(1) (1989) pp. 53-62.
- Burnham, W.M., Primary and transfer seizure development in the kindled rat. In J.A. Wada (ed.), *Kindling*, Raven Press, New York, 1976, pp. 61-83.
- Cain, D.P. and Corcoran, M.E., Intracerebral B-endorphin, Met-enkephalin and morphine: Kindling of seizure and handling induced potentiation of epileptiform effect., *Life Sci.*, 34 (1984) pp. 2535-2542.
- Cain, D.P. and Corcoran, M.E., Epileptiform effects of Met-enkephalin, B-endorphin and Morphine: kindling of generalized seizures and potentiation of epileptiform effects by handling., *Brain Research*, 338 (1985) pp. 327-336.
- Chang, K.J., Cooper, B.R., Hazum, E. and Cuatrecasas, P., Multiple opiate receptors: different regional distribution in the brain and differential binding of opiate and peptides opioid., *Molec. Pharmacol.*, 16 (1979a) pp. 91-104.

Chang, K.J. and Cuatrecasas, P., Multiple opiate receptors: enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity., *J. Biol. Chem.*, 254 (1979b) pp. 2610-2618.

Cogswell, C., On the local action of poison, *Lancet*, 2 (1852) pp. 488-490.

Collins, R.C., Kindling of neuroanatomic pathway during recurrent focal penicilin seizures., *Brain Res*, 150 (1978) pp. 503-517.

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

Delgado, J.M.R. and Sevillano, M., Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus., *Brain Res*, 86 (1961) pp. 205-215.

Della Bella, D., Corenzi, A., Frigeni, V. and Santini, V., Effect of carboxypeptidase inhibition on the in vivo and in vitro pharmacological properties of morphine and enkephalins., *Neuropharmacol.*, 18 (1979) pp. 719-721.

Elazar, Z., Motles, E., Ely, Y. and Simantov, R., Acute tolerance to excitatory effect of enkephalin microinjections in to hippocampus., *Life Sci.*, 24 (1979) pp. 541-548.

Engel, J.J.R. and Sharpless, N.S., Long-lasting depletion of dopamine in rat amygdala induced by kindling stimulation., *Brain Res.*, 136 (1977) pp. 381-386.

Fernandez-Guardiola, A., Modelos experimentales de epilepsia., *Psiquiatria*, 2(2) (1986) pp. 59-68.

Frenk, H., Pro- and anticonvulsant actions of morphine and the endogenous opioids: Involvement and interactions of multiple opiate and non-opiate systems., *Brain Res Review*, 6 (1983) pp. 197-210.

Frenk, H., Engel, J., Ackerman, R.F., Shavit, Y. and Liebeskind, J.C., Endogenous opioids may mediate post-ictal behavioral depression in amygdala kindled rat., *Brain Res*, 167 (1979) pp. 435-440.

Frenk, H., Urca, G. and Liebeskind, J.C., Epileptic properties of leucine and methionine enkephalin comparison with morphine and reversibility by naloxone, *Brain Res.*, 147 (1978) pp. 327-337.

Frenk, H., Watkins, L.R., Miller, J. and Mayer, J.D., Nonspecific convulsions are induced by morphine but not D-ala-methionine-enkephalinamide at cortical sites., *Brain Res.*, 299 (1984) pp. 51-59.

Glowinski, J., In vivo release of transmitters in the cat basal ganglia., *Fedn.Proc.*, 40 (1981) pp. 135-141.

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

Goddard, G.V., McIntyre, D.C. and Leech, C.K., A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation., *Exp. Neurol.*, 25 (1969) pp. 295-330.

Goldstein, A., Biology and Chemistry of the Dynorphin Peptides. In S. Udenfriend and J. Meienhofer (eds.), *Biology and Chemistry of the Dynorphin Peptides.*, Academic Press, London, 1984, pp. 96-145.

Gorenstein, C. and Snyder, S.H., Two distinct enkephalinases: solubilization, partial purification and separation from angiotensin converting enzyme., *Sciences*, 25 (1979) pp. 2065-2070.

Gubler, U., Seeberg, P., Hoffman, B.J., Gage, L.P. and Udenfriend, S., Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides., *Nature London*, 295 (1982) pp. 206-209.

Guzman, F.C., Alcaraz, M. and Fernandez-Guardiola, A., A rapid procedure to localize electrodes in experimental neurophysiology, *Bol. Est. Med. Biol.*, 16 (1958) pp. 29-31.

Hardy, C., Panksepp, J., Rossi, J. and Zolovick, A.J., Naloxone facilitates amygdaloid-kindling in rats, *Brain Research*, 194 (1980) pp. 293-297.

Hayashi, M. and Oshima, K., "Purification and characterization of arylamidase from monkey brain", *Journal Biochem.*, 81 (1977) pp. 631-639.

Henriksen, S.J., Bloom, E.F., McCoy, F., Ling, N. and Guillemin, R., B-endorphin induces nonconvulsive limbic seizures., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75 (1978) pp. 5221-5225.

Herbert, E. and Uhler, M., Polypeptide precursors to regulatory peptides., *Cell*, 30 (1982) pp. 1-2.

Hersh, L.B. and Mckelvy, F., "An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin", *Journal of Neurochemistry*, 36 (1981) pp. 171-178.

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) pp. 577-579.

Ikonomidou-Turski, C., Cavalheiro, E.A., Turski, W.A., Bortolotto, Z.A. and Turski, L., Convulsant action of morphine, D-(ala, D-leu)-enkephalin and naloxone in the rat amygdala: Electroencephalographic, Morphological and behavioral sequelae, *Neuroscience*, 20 (1987) pp. 671-686.

Ito, T., Hori, M., Yoshida, K. and Shimazu, M., Effect of anticonvulsants on seizure developing in the course of daily administration of pentetrazol to rats., *Eur. J. Pharmacol.*, 45 (1977) p. 165.

Iversen, L.L., *El Cerebro Scientific American, Espana*, 1980.

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

Joy, R.M., The effects of neurotoxicants on kindling and kindled seizure., *Fundamental and applied toxicology.*, 5 (1985) pp. 41-65.

Kanamatsu, T., Obie, J., Grimes, L., McGinty, J.F., Yoshikawa, K., Sabol, S. and Hong, J.S., Kainic acid alters the metabolism of Met-enkephalin and the level of dynorphin A in the rat hippocampus., *J. Neurosci.*, 6 (1986) pp. 3094-3102.

Khachaturian, H., Lewis, E., SKhafev, S.H. and Watson, S., Anatomy of the central nervous system opioids system., *Trens in Neuroscience*, (1985) pp. 111-118.

Khachaturian, H., Lewis, M.E., Schafer, M.K.-H. and Watson, S.J., Anatomy of CNS opioid systems, *Trends Neurosci*, 8 (1985) pp. 111-119.

Kosterlitz, H.W., Possible physiological significance of multiple endogenous opioid agonists. In R.F. Beers and E.G. Basset (eds.), *Mechanisms of Pain and Analgesic Compounds*, Raven Press, New York, 1979, pp. 207-214.

Le Gal La Salle, G., Amygdaloid Kindling in the rat : regional differences and general properties. In J.A. Wada (ed.), , Raven Press, New York, 1981, pp. 31-47.

Le Gal La Salle, G., Calvino, B. and Ben-Ari, Y., Morphine enhances amygdaloid seizures and increases interictal spike frequency in kindled rat, *Neurosci. Lett.*, 6 (1977) pp. 255-260.

Lewis, M.E., Khachaturian, H. and Watson, S.J., Visualization of opiate receptors and opioid peptides in sequential brain sections., *Life Sci.*, 31 (1982) pp. 1247-1250.

Linberg, L. and Dahl, J.L., Characterization of enkephalin release from rat striatum., *J. Neurochem.*, 36 (1981) pp. 506-512.

Liston, D., Patey, G., Rossier, J., Verbanck, P. and Vanderhaeghen, J., Processing of proenkephalin is tissue specific., *Science*, 225 (1984) pp. 734-737.

Mains, R.E., Eipper, B.A. and Ling, N., Common precursor to corticotropin and endorphins., *Proc. Natl. Academic. Sci.*, 43 (1977) pp. 107-116.

Malfroy, B., Swerts, J.P., AGugon, Roques, B.P. and Shartz, J.C., High-affinity enkephalin degrading peptidase in brain is increased after morphine., *Nature (London)*, 276 (1978) pp. 523-526.

- Malfroy, B., Swerts, J.P., Llorens, C. and Schwartz, J.-C., Regional distribution of a high affinity degrading peptidase (enkephalinase) and effects of lesion suggest localisation in the vicinity of opiate receptors in brain., *Neurosci. Lett.*, 11 (1979) p. 329.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H. and Watson, S.J., Anatomy of CNS opioid receptors, *Trens Neurosci*, 11 (1988) pp. 308-314.
- Martin, W.E., Eades, C.G., Thompson, J.A., Hupper, R.E. and Gilbert, P. E., The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the non-dependent and morphine dependent chronic spinal dog., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 197 (1976) pp. 517-532.
- Martin, W.R., Eades, G.G., Thompson, W.O., Thompson, J.A. and Flanary, H. G., Morphine physical dependence in the dog., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 189 (1974) pp. 759-771.
- McGinty, J.F., Kanamatsu, T., Obie, J., Dyers, R.S., Mitchell, L.C. and Hong, J.S., Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity but decreases dynorphin-A-like immunoreactivity in rat hippocampus., *Neurosc. Lett.*, 71 (1986) pp. 31-36.
- McNamara, J.O., Byrne, M.C., Dasheiff, R.M. and Fitz, J.G., The kindling model of epilepsy: A review., *Prog. Neurobiol.*, 15 (1980) pp. 139-159.
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, J., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. and Numa, S., Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropine-beta-lipotropin precursor., *Nature London*, 278 (1979) pp. 423-427.
- Nakata, Y., Chang, K., Mitchell, C. and Hong, J.S., Repeated electroconvulsive shock downregulates the opioid receptors in rat brain., *Brain Research*, 346 (1985) pp. 160-163.
- Naranjo, J.R., Iadarola, M.J. and Costa, E., Changes in the dynamic state of brain proenkephalin-derived peptides during amygdaloid kindling., *J. Neurosci Res*, 16 (1986) pp. 75-87.
- Neal, H. and Keane, P.E., The effect of local microinjection of opiates and enkephalin into forebrain on the electrocorticogram of the rat., *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 45 (1978) p. 655.
- Ninkovic, M., Hunt, S.P., Emson, P. and Iversen, L.L., The distribution of multiple opiate receptors in bovine brain., *Brain Res*, 214 (1981) pp. 163-167.
- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S. and Numa, S., Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin., *Nature*, 295 (1982) pp. 202-206.
- Noda, M., Teranishi, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Notake, M., Nakanishi, S. and Numa, S., Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene., *Nature*, 297 (1982 b) p. 431.

- Numa, S., The peptides: analysis, synthesis, biology Academic Press, London 1984.
- Osborne, H. and Herz, A., K - evoked release of Met-enkephalin from rat striatum in vitro: effect of putative neurotransmitters and morphine., Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol., 310 (1980) pp. 203-209.
- Osborne, H., Holtt, V. and Herz, A., Potassium induced release of enkephalin from rat striatal slices., Eur. J. Pharmacol., 48 (1978) pp. 219-221.
- Patey, G., Baune de la, S., Schwartz, J.C., Gros, C., Roques, P.B., Fournie-Zaluski, M.C. and Soroca Lucas, E., Selective protection of methionine enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition., Science, 212 (1981) p. 1153.
- Pert, C.B., Kuhar, M. and Snyder, S.H., Autoradiographic localization of the opiate receptor in the rat brain., Life Sci., 16 (1975) pp. 1849-1854.
- Pert, C.B., Kuhar, M.J. and Snyder, S.H., The opiate receptor. Autoradiographic localization in rat brain., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73 (1976) pp. 3729-33.
- Pert, C.B. and Snyder, S.H., Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue., Science, 179 (1973) pp. 1010-1014.
- Post, R.M., Davenport, S., Pert, A. and Squillace, K., Lack of effect of an opiate agonist and antagonist on the development of amygdala kindling in the rat., Commun. Psychopharmac., 3 (1979) pp. 185-190.
- Post, R.M. and Kopanda, R.T., Cocaine, Kindling and psychosis., American J. Psychiat., 133 (1976) pp. 627-634.
- Racine, R., Kindling: The first decade., Neurosurgery, 3 (1978) pp. 234-252.
- Racine, R., Kairiss, E. and Smith, G., Kindling mechanisms: The evolution of the burst response versus enhancement. In J.A. Wada (ed.), kindling 2, Raven Press, New York, 1981, pp. 15-37.
- Racine, R., Livingston, K. and Joaquin, A., Effects of procaine hydrochloride, diazepam and diphenylhydantoin in seizure development in cortical and subcortical structure in rats., Electroenceph. clin. Neurophysiol., 38 (1975) pp. 355-365.
- Racine, R. and Zaide, J., A further investigation into the mechanisms underlying the kindling phenomenon. In K.E. Livingston and D. Hornikewicz (eds.), Limbic Mechanisms. Plenum, New York, 1978, pp. 457-493.
- Racine, R.J., Modification of seizure activity by electrical stimulation: I after discharge threshold., Electroenceph. clin. Neurophysiol., 32 (1972a) pp. 269-279.

- Racine, R.J., Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure., *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 32 (1972b) pp. 281-294.
- Racine, R.J., Burham, W.M., Gartner, J.G. and Levitan, D., Rates of motor seizure development in rats subjected to electrical brain stimulation: Strain and interstimulation interval effects., *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 35 (1973) pp. 553-556.
- Ritcher, J.A., Wesche, D.L. and Frederickson, R.C.A., K⁺-stimulated release of Leu- and Met-enkephalin from rat striatal slices: lac effect of morphine and naloxone., *Eur. J. Pharmacol.*, 56 (1979) pp. 105-113.
- Roques, B.P., Fournie-Zaluski, M.C., Soroca, E., Lecomte, J.M., Malfroy, B., Llorens, C. and Schwartz, J.C., The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice, *Nature*, 288 (1980) p. 286.
- Sawynok, J., Labella, F.S. and Pinsky, C., Effects of morphine and naloxone on the K⁺-stimulated release of methionine-enkephalin from slices of rat corpus striatum., *Brain Res*, 189 (1980) pp. 483-493.
- Simantov, R. and Snyder, S.H., Morphine-like peptides in mammalian brain: isolation structural elucidation, and interaction with the opiate receptor., *Proc. Natl. Academic. Sci. U.S.A.*, 73 (1976) pp. 2515-2519.
- Simon, E.J., Hiller, J.M. and Edelman, I., Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic H-etorphine in rat brain homogenate., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69 (1973) pp. 1835-1837.
- Snead, D.C. and Bearden, L.J., Anticonvulsant specific for petitantagonized epileptogenic effect of leucine enkephalin., *Science*, 210 (1980) pp. 1031-1034.
- Snead, D.C.I.I.I. and Bearden, L.J., The epileptogenic spectrum of opiate agonists., *Neuropharmacology*, 21 (1982) pp. 1137-1144.
- Sprick, V., Ortiz, M.S., Ornstein, K. and Huston, H.P., Spreading depression induced by microinjection of enkephalin into hippocampus and neocortex., *Brain Res.*, 210 (1981) p. 243.
- Terenius, L., Stereospecific interaction between narcotic analgesic and a synaptic plasma membrane fraction from rat brain, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 33 (1974) pp. 377-384.
- Tortella, C.F., Cowan, A. and Adler, W.M., Comparison of the anticonvulsant effect of opioid peptides and etorphine in rats after ICV administration., *Life Sciences*, 10 (1981) pp. 1039-1045.
- Tortella, F.C., Moreton, J.E. and Khazan, N., Electroencephalographic and behavioral effects of D-ala-methionine enkephalinamide and morphine in the rat., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 206 (1978) pp. 633-643.

Traficante, L.J., Retrosen, J., Siekierski, J., Tracer, H. and Gershon, S., "Enkephalin inactivation by N-terminal tyrosine cleavage: Purification and partial characterization of highly specific enzyme from human brain., *Life Sci*, 26 (1980) pp. 1697-1706.

Urca, G., Frenk, H., Liebenskind, J.C. and Taylor, A.N., Morphine enkephalin: analgesic and epileptic properties., *Science*, 197 (1977) pp. 83-85.

Vindrola, O., Asai, M., Zubieta, M. and Linares, G., Brain content of immunoreactive leu-enkephalin and met-enkephalin after pentylenetetrazol-induced convulsions., *Eur. J. Pharmacol.*, 90 (1983) pp. 85-89.

Vindrola, O., Asai, M., Zubieta, M., Talavera, E. and Rodriguez, E., Pentylenetetrazol kindling produces a long lasting elevation of IR-Met enkephalin but not IR-Leu-enkephalin in rat brain., *Brain Res.*, 297 (1984) pp. 121-125.

Vindrola, O., Briones, R., Asai, M. and Fernandez-Guardiola, A., Brain content of Leu and Met-enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat., *Neurosc. Letter*, 26 (1981a) pp. 125-130.

Vindrola, O., Briones, R., Asai, M. and Guardiola, A.F.e.r.n.a.n.d.e.z., Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in rat brain., *Neurosc. Letters*, 21 (1981b) pp. 39-43.

Vosu, H. and Wise, R.A., Cholinergic kindling in the rat: comparison of caudate, amygdala and hippocampus., *Behav. Biol.*, 13 (1975) pp. 491-495.

Wada, J.A., The clinical relevance of kindling: Species brain sites and seizure susceptibility. In K.E. Livingston and O. Hornykewicz (eds.), *In: Limbic Mechanisms*, Plenum, New York, 1978, pp. 369-388.

Waterfield, A., Smokcum, F.W., Hughes, J., Kosterlitz, H.W. and Henderson, G., In vitro pharmacology of the opioid peptides, enkephalins and endorphins., *Eur. J. Pharmacol.*, 43 (1977) pp. 107-116.

White, J.D., Gall, C.M. and McKelvy, J.F., Enkephalin biosynthesis and enkephalin gene expression are increased in hippocampal mossy fibers following a unilateral lesion of the hilus., *J. Neurosci.*, 7 (1987) pp. 753-759.

Yoshikawa, K., Hong, J.S. and Sabol, S.L., Electroconvulsive shock increases preproenkephalin messenger RNA abundance in rat hypothalamus., *Proc. Natl. Academic. Sci.*, 82 (1985) pp. 589-593.

Zamir, N., Weber, E., Palkovits, M. and Brownstein, M., Differential processing of prodynorphin and proenkephalin in specific regions of the rat brain., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) pp. 6886-6889.

BRE 14410

Regional brain IR-Met-, IR-Leu-enkephalin concentrations during progress and full electrical amygdaloid kindling

Esther Talavera², Imelda Omaña-Zapata³, Miguel Asai² and Miguel Condés-Lara¹

¹Departamento de Neurofisiología, and ²Laboratorio de Análisis Químicos, División de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calzada México-Xochimilco 101, México, D.F. 14370 (Mexico) and ³Coordinación de Estudios de Posgrado Investigación y Desarrollo Académico, ENEP-Zaragoza, UNAM, México (Mexico)

(Accepted 20 September 1988)

Key words: Amygdaloid kindling; Behavior; Electrophysiology; IR-Met-enkephalin; IR-Leu-enkephalin; Long-lasting change; Amygdala; Hippocampus

Using amygdaloid kindling in chronic rats, we were able to observe behavioral, electrographic and IR-Met- and IR-Leu-enkephalin changes throughout the progress of different stages of convulsive activity. Rats presenting the initial stages of kindling, rats presenting the first generalized motor seizure, and rats with at least 10 generalized seizures were sacrificed 24 h after the last stimulus; also rats with at least 10 generalized seizures but sacrificed 21 days after the last seizure were compared with control and sham-operated groups of rats. The IR-Met and IR-Leu enkephalin concentrations in each group were measured in the striatum, amygdala, hypothalamus, medulla oblongata (including pons), hippocampus, mid-brain, spinal cord and cerebral cortex. A progressive increase in IR-Leu-enkephalin in amygdala and hippocampus was observed over the course of kindling. These increases remained until 21 days after rats were fully kindled (at least 10 generalized seizures). We observed increased and decreased concentration of each peptide in different regions. We discussed the regional and the differential effects of each peptide. The increased concentrations in limbic structures were associated with the amygdaloid increased excitability through the kindling process. We suggest that the decreases in concentrations are related with structures involved in the output behavior manifestations produced by kindling stimulation.

INTRODUCTION

Amygdaloid kindling is an animal model of experimental epilepsy in which repeated administration of an initially subconvulsive amygdaloid electrical stimulus first provokes short afterdischarges (AD), characterized as spike-wave complexes of simple morphology. As the kindling proceeds, the AD acquires a complex configuration with increases in amplitude, frequency and duration³⁴. The animal finally displays generalized tonic-clonic seizures^{17,31,30}.

Numerous lines of evidence indicate that enkephalins are putative mediators in kindling because of their epileptogenic properties after intracerebral administration^{2,14,22,34,36,37}.

Endogenous opioid peptides also affect the severity of amygdaloid kindled seizures and the duration

of postictal behavioral depression^{7,12,15,19,27,33,35}.

Amygdaloid injection of [D-Ala²,D-Leu⁵]enkephalin or morphine produces electroencephalographic and behavioral seizures. Pretreatment of animals with systemic as well as simultaneous microinjection of naloxone into the amygdala failed to block the development of convulsant activity produced by morphine. In contrast, naloxone or diazepam, administered prior to the microinjection of [D-Ala²,D-Leu⁵]enkephalin abolished the epileptogenic effects of the drug²².

Amygdaloid-kindled seizure also increases endogenous opioid peptide levels. Early studies by Vindrola et al.^{39,40} showed that the enkephalin content is increased in cerebral hemispheres and the Leu- and Met-enkephalin levels changed independently during the development of fully kindled rats.

Correspondence: M. Condés-Lara, Departamento de Neurofisiología, División de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calzada México-Xochimilco 101, México, D.F. 14370, México.

Leu-enkephalin showed a progressive increase during kindling. In contrast, Met-enkephalin was not modified during early stages of kindling, but was found to be increased after the animal had presented 5 or more consecutive generalized motor seizures. These authors conclude that Leu-enkephalin is related to the development of kindling, whereas Met-enkephalin levels change only as a consequence of the generalized seizures.

The relationship between enkephalins and experimental epilepsy was confirmed by other recent studies in more specific brain regions of fully kindled rats^{21,22}. Also, investigations of hippocampal neuropeptides have already established increases in Met-enkephalin biosynthesis after different convulsive procedures^{24,41}.

However, enkephalins play an important role in other functions^{1,11,12} and have a large distribution in the nervous system²⁵. Amygdaloid kindling allowed us to observe the electroencephalograph as well as behavioral evolution of experimental epilepsy and allowed us to study IR-Leu and IR-Met enkephalin regional levels in rat brains in order to better understand the regional role of these peptides.

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats weighing 280–320 g were individually housed with a 12-h light:12-h dark cycle and ad libitum feeding. Under pentobarbital anesthesia (60 mg/kg, i.p.), a bipolar electrode was stereotaxically implanted into the left amygdala of rats according to the coordinates of Albe-Fessard et al.² (anterior, 5.8; lateral, 4.5; depth, 2.5). The electrodes and connector were fixed to the cranium by means of two steel screws embedded in dental acrylic. While introducing the electrode in the amygdala, the neuronal activity was monitored and the somatic and olfactory neuronal evoked activities were tested to ensure that the electrode was well placed.

Kindling stimulation started 5 days after surgery and the amygdala was stimulated twice daily (08.00 and 15.00 h), 5 days week. The stimulations were delivered through a Grass PSIU-6 constant-current source and Grass S-88 stimulator. A 1-s train of rectangular pulses of 1-ms duration was given at 60 Hz. The amount of current delivered to each animal

was between 80 and 140 μ A. The threshold intensity was determined by starting at 70 μ A and increasing in steps of 10 μ A until an AD of about 10 s was triggered. These ADs were typically accompanied by behavioral arrest or ipsilateral eye blinking. The stimulation intensity was fixed and maintained for each animal along all experimental stimuli sessions. The electroencephalographic activity and electrical stimulation were performed by the same electrode using a break-away device.

Kindling was evaluated by the AD duration^{30,31} and seizures were classified behaviorally according to the stages described by Racine³⁰: I, facial clonus and eye blinking; II, head nodding; III, forelimb clonus; IV, rearing; V, rearing and falling. A full-kindling motor seizure with loss of postural control will be referred to as stage V, generalized seizures (GS).

The neuronal activity of the amygdala was amplified, displayed in the scope and photographed to measure the AD duration.

The animals were divided in the following 6 groups. (1) Control: 50 naive rats. (2) Sham: 10 rats sham-operated; implanted but not stimulated; this group received the same schedule of handling as the kindled animals. (3) 2–3: 10 rats amygdaloid stimulated to reach the behavioral stages II–III. (4) 1 GS: 10 rats amygdaloid stimulated to reach their first stage V with GS. (5) 10 GS: 10 rats amygdaloid stimulated presenting at least 10 stage V of generalized seizures; this was a full-kindled group. (6) LLC: 10 rats amygdaloid stimulated presenting at least 10 stage V; this was a full-kindled group. In order to observe if full-kindled rats show long-lasting changes (LLC) in IR-Met- and IR-Leu-enkephalin levels this group was sacrificed 21 days after the last generalized seizure.

The groups 2–3, 1 GS and 10 GS were sacrificed 24 h after the last electrical stimulation, thus our results of IR-Met- and IR-Leu-enkephalin determination levels corresponding to this period after the last stimuli.

The experimental animals were killed by decapitation and non-kindled control rats were run parallel for each group. The cerebral cortex, striatum, hypothalamus, midbrain, hippocampus and medulla oblongata including pons were dissected out on a cold plate (0–4 °C) using a modification of the

procedures described by Glowinski and Iversen^{1b}. Also we dissected the amygdala following the method of Engel et al.¹⁰ and the spinal cord at brachial plexus level.

The dissection modifications were the following: (1) A first transverse section was made just posterior to the olfactory cortex (A 6670 according to the atlas of König and Klippel^{2b}); and (2) the hypothalamus lateral cut was performed 2 mm from the midline.

Immediately after dissection tissues were frozen, weighed and incubated in 6 vols. of 0.1 N HCl at 95 °C for 15 min, cooled in an ice bath, homogenized and then centrifuged at 50,000 g for 60 min at 4 °C. The supernatant was purified through amberlite XAD-2 columns (8 × 0.7 cm) at a flow rate of 0.5 ml/min. Enkephalins were analyzed in triplicate by radioimmunoassay as described previously^{3b}.

The Met-enkephalin antiserum showed a 100% cross-reactivity with Met-(o)-enkephalin, 0.3% with

Leu-enkephalin, 0.2% with the heptapeptide ME-Arg-Phe and less than 0.01% with ME-Arg, dynorphin-(1-13), dynorphin-(1-8), the octapeptide ME-Arg-Phe-Leu, α -, γ - and β -endorphin.

The Leu-enkephalin antiserum displayed a cross-reactivity of 3.83% with Met-enkephalin, 4.33% with LE-Arg, 0.53% with ME-Arg, 0.37% with the heptapeptide ME-Arg-Phe, less than 0.01% with Met-(o)-enkephalin, octapeptide ME-Arg-Phe-Leu and dynorphin-(1-8). Cross-reactivity was negligible with α -, γ - and β -endorphin.

The dilution curves of tissue extracts were parallel to those obtained with authentic enkephalins. Tissue contents of each enkephalin will be expressed as pmol of immunoreactivity (IR)enkephalin/g w. wt.

RESULTS

The progressive intensity of the kindling process

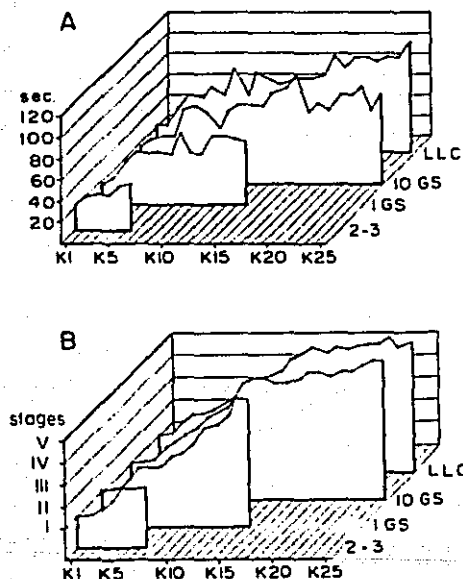


Fig. 1. The AD duration (A) and behavioral stages evolution (B) during kindling process for the different experimental groups (2-3, 1 GS, 10 GS and LLC). Note a continuous increase in AD duration after the first generalized seizure at K15. Abscissa: number of stimulations.

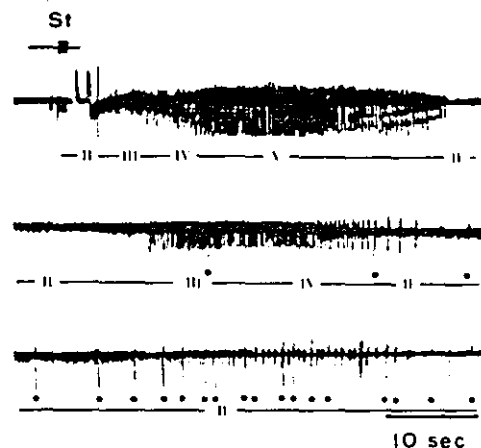


Fig. 2. Continuous electrographic recording of the amygdala afterdischarge in one rat of 10 GS group. The record corresponds to the 20 amygdala stimulations and the 5 stage V. The electroencephalographic seizure was accompanied by a bilaterally generalized motor seizure. The first trace shows the basal activity, the stimulus artifact and the AD. The second trace shows a recurrent electroencephalographic seizure accompanied by an arrest, behavioral stereotypes and WDS. The third trace shows another recurrent electroencephalographic seizure less intense and WDS. ●: WDS; St: stimulus artifact. The numbers refer to the behavior convulsion stages described by Racine¹⁰. Stage II includes automatisal behavior.

TABLE I

IR-Met- and IR-Leu-enkephalin levels in various brain structures

Analysis of variance was applied for each structure and peptide. The values are *F* and *P* obtained from 8 animals of the 6 groups (control, sham, 2-3, 1 GS, 10 GS and LLC).

Brain region	<i>IR-Met-enkephalin</i>	<i>IR-Leu-enkephalin</i>
Striatum	<i>F</i> 3.302	<i>F</i> 1.118
	<i>P</i> <0.013	<i>P</i> <0.361
Amygdala	<i>F</i> 52.998	<i>F</i> 41.735
	<i>P</i> <0.000	<i>P</i> <0.000
Hypothalamus	<i>F</i> 2.665	<i>F</i> 1.192
	<i>P</i> <0.031	<i>P</i> <0.323
Medulla	<i>F</i> 0.899	<i>F</i> 15.668
	<i>P</i> <0.487	<i>P</i> <0.000
Hippocampus	<i>F</i> 8.435	<i>F</i> 9.730
	<i>P</i> <0.000	<i>P</i> <0.000
Mid-brain	<i>F</i> 0.641	<i>F</i> 5.577
	<i>P</i> <0.528	<i>P</i> <0.000
Spinal cord	<i>F</i> 5.017	<i>F</i> 2.746
	<i>P</i> <0.007	<i>P</i> <0.060
Cortex	<i>F</i> 2.155	<i>F</i> 2.262
	<i>P</i> <0.106	<i>P</i> <0.096

could be established in the different experimental groups. Group 2-3 showed AD durations of 37.75 ± 8.78 s ($\bar{x} \pm$ S.E.M.) and reached this stage after 5 stimulations. Group 1 GS showed AD durations of 55.33 ± 6.14 s when the first generalized seizure, stage V was present, at 14.53 ± 1.37 amygdala stimulations. Group 10 GS presented AD durations of 80.00 ± 11.36 s at 22 amygdala stimulations. Group LLC exhibited AD durations of 97.25 ± 7.67

s after 24 stimulations. Both 10 GS and LLC groups reached the 10 generalized seizures, stage V, after 22 ± 2 stimulations. However, we continued up to 25 stimulations. These results are plotted in Fig. 1. It should also be noted in 10 GS and LLC groups that we also observed an increase of AD duration and behavioral intensity along successive generalized seizures. This lets us observe hind limb clonus after about 5 consecutive seizures and the presence of recurrent seizures as it is shown in Fig. 2. The variability in the presence of the recurrent seizures allowed us to measure only the after-discharge duration. Moreover, recurrent seizures were not observed in all experimental animals; also wet dog shake (WDS) manifestations were variable but as a general rule their presentations were associated with the end of convulsive activity.

The *IR-Met-* and *IR-Leu-enkephalin* levels were determined for each experimental group and ran parallel with control naive rats (10 rats for each experimental group). Analysis of variance was used to test for overall statistical significance for each structure and peptide in the different experimental groups. These results are shown in Table I. If a significant overall effect was observed after analysis of variance Student's *t*-test was applied.

Control rats (not implanted) and sham-operated (not kindled) *IR-Met-* and *IR-Leu-enkephalin* levels in all brain regions studied were not significantly different, so our experimental groups' results were only compared with control rats.

TABLE II

IR-Met-enkephalin concentrations during evolution and fully electrical amygdaloid-kindled rats in various brain regions

Results are expressed as pmol/g tissue. Each value is the mean \pm S.E.M. of each brain region of group. Significant levels were calculated using Student's *t*-test. (-) not quantified.

Brain region	<i>IR-Met-enkephalin</i>					
	Control	Sham	2-3	1GS	10GS	LLC
Striatum	2013 \pm 82	2144 \pm 101	1860 \pm 109	2047 \pm 150	1524 \pm 82**	1502 \pm 127*
Amygdala	329 \pm 12	397 \pm 48	526 \pm 23*	1036 \pm 87*	812 \pm 64*	411 \pm 43***
Hypothalamus	718 \pm 27	782 \pm 84	752 \pm 54	757 \pm 55	926 \pm 69*	694 \pm 42
Medulla	331 \pm 8	285 \pm 8	251 \pm 7**	302 \pm 8	280 \pm 9	279 \pm 7**
Hippocampus	100 \pm 4	93 \pm 6	96 \pm 7	120 \pm 8	152 \pm 15*	80 \pm 5
Mid-brain	330 \pm 22	361 \pm 37	379 \pm 22	310 \pm 17	323 \pm 17	301 \pm 27
Spinal cord	144 \pm 7	139 \pm 12	-	126 \pm 2	127 \pm 8	171 \pm 19
Cortex	92 \pm 7	80 \pm 5	-	131 \pm 13***	127 \pm 13***	-

P* < 0.003; *P* < 0.005; ****P* < 0.02.

TABLE III

IR-Leu-enkephalin concentrations

Legend as in Table II.

Brain region	IR-Leu-enkephalin					
	Control	Sham	2-3	1 GS	10 GS	LLC
Striatum	352 ± 15	415 ± 31	369 ± 18	335 ± 36	314 ± 28	328 ± 26
Amygdala	107 ± 3	100 ± 8	147 ± 7*	164 ± 8*	220 ± 12*	146 ± 6*
Hypothalamus	259 ± 7	234 ± 15	240 ± 14	273 ± 29	264 ± 18	224 ± 17
Medulla	107 ± 6	111 ± 12	99 ± 3	50 ± 7*	52 ± 6*	65 ± 5*
Hippocampus	47 ± 4	46 ± 1	69 ± 3*	81 ± 5*	91 ± 9*	64 ± 1*
Mid-brain	62 ± 2	58 ± 1	56 ± 2	48 ± 3***	63 ± 3	42 ± 3*
Spinal cord	58 ± 3	67 ± 7	49 ± 4	-	-	67 ± 8
Cortex	25 ± 2	24 ± 2	-	18 ± 2***	25 ± 1	-

* $P < 0.003$; *** $P < 0.02$.

Table II shows the IR-Met enkephalin levels in several brain regions. The pentapeptide increased significantly in amygdala of the 2-3, 1 GS, 10 GS and LLC groups, in the hypothalamus and hippocampus of the 10 GS group. In the striatum there is a decrease of the IR-Met enkephalin content in the 10 GS and LLC groups, also in the medulla in the 2-3 and LLC groups. The cerebral cortex levels also increased in the 1 GS and 10 GS. No changes were observed in the mid-brain and the spinal cord in all experimental groups.

Table III shows the results obtained for IR-Leu-enkephalin. This pentapeptide increases its concentration progressively through the kindling devel-

opment, in the 2-3, 1 GS, 10 GS and LLC groups in the amygdala and hippocampus (see Fig. 3). The IR-Leu-enkephalin decreases its concentration in the medulla in the 1 GS, 10 GS and LLC groups. Also its levels decrease in the mid-brain in the LLC group and the cerebral cortex in the 1 GS group. No changes were observed in the striatum, hypothalamus and spinal cord.

DISCUSSION

Kindling as an experimental model of epilepsy lets us observe, in different groups of animals, the behavior, electroencephalographic and biochemical changes that occurred during kindling. Our electroencephalographic and behavioral results are in agreement with reported amygdala kindling rates of rats^{3,30,31}. However, we observed little variability in rats reaching the first stage V in which the animals displayed a generalized motor seizure. This variability could be due to a small difference in electrode locations into the amygdala nucleus. Cain and Corcoran⁶ reported that the anterior amygdaloid area kindled more rapidly than the posterior amygdaloid area. These results could explain our experimental animal variability in reaching the first stage V, in full kindled rats. However, we only used homogeneous animals in each experimental group, in order to avoid this slight variability.

During the completion of full kindled groups (10 GS and LLC) we observed a progressive AD increase and a more complex behavior manifestation

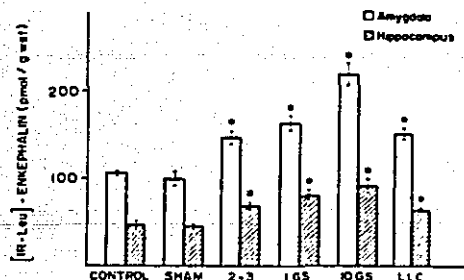


Fig. 3. Progressive increase of IR-Leu-enkephalin concentration levels in the amygdala and hippocampus through the different experimental groups. Observe the significant evolution in the 2-3, 1 GS, 10 GS and the remaining high level in the LLC group. Concentrations in LLC group were determined 21 days after the last amygdala stimulation which provokes the last of at least 10 stage V of generalized seizures.

accompanying successive seizures. This involved a hind limb clonus like that reported by Joy²³ as stage 4 of motor seizures. This particular type of convulsive manifestation could only be observed after repeated stage Vs. described by Racine²⁰. Therefore, in both of our fully kindled groups not all animals presented the hind limb characteristic of stage 4 of Joy²³, and for this reason we used the Racine classification²⁰.

Several reports pointed out that morphine and opioid peptides can evoke epileptiform activity when administered intracranially.^{4,5,6,8,9,13,14,20,32,37} This epileptiform activity was accompanied by a variety of convulsive behaviors such as myoclonic twitches, automatisal behavior and 'wet dog shakes'.^{13,14,20,37} This has led us to suggest that the disruption of regulatory mechanisms that control endogenous opioids might contribute to the etiology or elaboration of epilepsy.^{6,14,37} Also it was reported⁵ that repeated Met-enkephalin and β -endorphin administration resulted in a gradual development of progressive strong convulsions in rats, culminating in bilaterally generalized convulsions that strongly resembled those that occur during electrical amygdaloid kindling. As a general feature this hypothesis of action is in agreement with our results, but our results also show that the regulatory mechanism exerted by endogenous opioids is regionalized to structures closely related to the amygdala. However, Yoshikawa et al.⁴² using 10 days of electroconvulsive shock reported an increase in Met-enkephalin in striatum and hypothalamus and did not observe modifications of this peptide in the hippocampus. On the contrary, our results in the 10 GS group exhibited a decrease in the striatum and an increase in the hippocampus. These disappointing results are surely due to the different experimental model of epilepsy used.

The progressive increase in IR-Leu-enkephalin concentration in the amygdala and hippocampus in the 2-3, 1 GS and 10 GS groups and IR-Met-enkephalin in the amygdala in the same groups were well correlated with the enhanced excitability produced by the kindling procedure. Moreover, the high levels in IR-Leu-enkephalin remain 21 days after the last stimulus, suggesting long-lasting changes in biochemical synthesis of this pentapeptide. Nevertheless, IR-Met- and IR-Leu-enkephalin

concentrations in amygdala and hippocampus show a tendency to return to control concentrations in the LLC group. McGinty et al.²⁸ using amygdaloid kindling in rats reported an IR-Met-enkephalin increase in hippocampus after 24 h of two stage V presentations. We also observed an increase in the 1 GS group but it did not reach our significant minimum level. This fact could be due to a progressive concentration change during consecutive seizures. The same authors²⁸ reported that the hippocampus increase in IR-Met-enkephalin does not remain after 28 days of the kindling completion (two stages V). Our IR-Met-enkephalin concentration results in hippocampus in the LLC group show a tendency to control levels but remain significantly increased 21 days after completion of kindling (more than 10 stage V). Unfortunately, we did not measure the enkephalin levels at 28 days and it is possible that they may be reduced between 21 and 28 days. These authors²⁸ conclude that the opioid peptides do not participate in the initiation or permanence of kindling. It is interesting to note the different criterion used in defining full (10 seizures) vs completely (2 seizures) and permanence vs long-lasting changes in the amygdaloid kindling procedure.

Earlier results of our group show an increase in IR-Leu-enkephalin in the ipsilateral amygdaloid kindling hemisphere. This increase was progressive during the kindling process.^{39,40}

Our actual results show this increase confined to limbic structures closely related with the stimulation site (amygdala and hippocampus). It also showed that IR-Met-enkephalin increases after as few as 5 ADs in the amygdala. The parallelism between these increased levels and the AD duration suggests that enkephalins play a role in the development of kindling, and not only in generalized seizures as was described by Vindrola et al.⁴⁰ for IR-Met-enkephalin. Nevertheless, it is also claimed that enkephalinergic neurons participate in the development and the spreading of kindling phenomenon after amygdaloid stimulation and they do not play any role in mediating the maintenance of the kindling state²⁸.

Under normal conditions the highest levels of both pentapeptides were found in the striatum. In the 10 GS and LLC groups, IR-Met-enkephalin decreased but IR-Leu-enkephalin did not present

modifications indicating a differential specific function of each pentapeptide in the same structure. The diminution of IR-Met-enkephalin in the striatum could cause a disinhibitory effect which contributes to the seizure motor manifestations.

Our results showing an increase in Met- and Leu-enkephalin could be due to enhanced biosynthesis of the enkephalin precursors. This was supported by several lines of evidence reporting a marked increase in preproenkephalin messenger RNA in electroconvulsive shock⁴², seizures produced by kainic acid²⁴, hilus lesion⁴¹ and amygdaloid kindling²⁶.

Kanamatsu et al.²⁴ suggest that kainic acid-induced seizures cause an increase in Met-enkephalin release, followed by a compensatory increase in Met-enkephalin biosynthesis. This increase in

enkephalin biosynthesis could be stimulated by enhanced neuronal activity in the form of recurrent seizures as was proposed⁴¹.

It is interesting to point out that our results showed IR-Met- and IR-Leu-enkephalin concentration increase and also decrease but in different brain areas. We suggest that the decreased concentrations are closely related with structures involved in motor functions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mr. Abel Ortega and Mr. Gabriel Linares for excellent technical assistance. This work was partially supported by research grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PCEXCNA-040661 and PCSABNA-022618).

REFERENCES

- Akil, H., Watson, S.J., Young, E., Lewis, M.E., Khachaturian, H. and Walker, J.M., Endogenous opioids: biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 7 (1984) 223-255.
- Albe-Fessard, D., Stutinsky, F. and Libouhan, S., *Atlas Stéréocaxique du Diencéphale du Rat Blanc*, C.N.R.S., Paris, 1971.
- Albright, P.S., Burnham, W.M. and Okasaki, M., Effect of atropine sulfate on amygdaloid kindling in the rat. *Exp. Neurol.*, 66 (1979) 409-412.
- Bloom, F.E., Rossier, J., Battemberg, E., Bayon, A., French, E., Henriksen, S., Siggins, G., Segal, D., Browne, R., Ling, N. and Guillemin, R., β -Endorphin: cellular localization, electrophysiological and behavioral effects. In E. Costa and M. Trabucchi (Eds.), *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, Vol. 18, Raven, New York, 1978, pp. 89-109.
- Cain, D.P. and Corcoran, M.E., Intracerebral β -endorphin, Met-enkephalin and morphine: kindling of seizures and handling induced potentiation of epileptiform effect. *Life Sci.*, 34 (1984) 2535-2542.
- Cain, P.D. and Corcoran, E.M., Epileptiform effects of Met-enkephalin, β -endorphin and morphine: kindling of generalized seizures and potentiation of epileptiform effects by handling. *Brain Research*, 338 (1985) 327-336.
- Caldecott-Hazard, S., Shavit, S., Ackermann, R.F., Engel, J. Jr., Frederickson, R.C.A. and Liebeskind, J.C., Behavioral and electrographic effects of opioids on kindled seizures in rats. *Brain Research*, 251 (1982) 327-333.
- Elazar, Z., Motles, E., Ely, Y. and Simantov, R., Acute tolerance to the excitatory effect of enkephalin microinjections into hippocampus. *Life Sci.*, 24 (1979) 541-548.
- Elazar, Z., Simantov, R. and Motles, E., Local electrographic effects of Leu-enkephalin microinjections into the brain. *Electroencephalograph. Clin. Neurophysiol.*, 54 (1982) 41-48.
- Engel, J. Jr. and Sharpless, N.S., Long-lasting depletion of dopamine in rat amygdala induced by kindling stimulation. *Brain Research*, 136 (1977) 381-386.
- Frederickson, R.C.A. and Geary, L.E., Endogenous opioid peptides: review of physiological, pharmacological and clinical aspects. *Prog. Neurobiol.*, 19 (1982) 19-69.
- Frenk, H., Engel, J. Jr., Ackermann, R.F., Shavit, Y. and Liebeskind, J.C., Endogenous opioids may mediate postictal behavioral depression in amygdaloid-kindled rats. *Brain Research*, 167 (1979) 435-440.
- Frenk, H., McCarthy, B. and Liebeskind, J.C., Different brain areas mediate the analgesic and epileptic properties of enkephalin. *Science*, 200 (1978) 335-337.
- Frenk, H., Urea, G. and Liebeskind, C.J., Epileptic properties of leucine and methionine-enkephalin: comparison with morphine and reversibility by naloxone. *Brain Research*, 147 (1978) 327-337.
- Frenk, H., Watkins, L., Miller, J. and Mayer, J.D., Nonspecific convulsions are induced by morphine but not *D*-Ala²-methionine enkephalinamide at cortical sites. *Brain Research*, 299 (1984) 51-59.
- Glowinski, J. and Iversen, L.L., Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J. Neurochem.*, 13 (1966) 655-669.
- Goddard, G.V., Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature (Lond.)*, 214 (1967) 1020-1021.
- Goddard, G.V., McIntyre, D.C. and Leech, C.K., A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.*, 25 (1969) 295-330.
- Hardy, C., Panksepp, J., Rossi, J. and Zolovick, A.J., Naloxone facilitates amygdaloid-kindling in rats. *Brain Research*, 194 (1980) 293-297.
- Henriksen, S.J., Bloom, F.E., McCoy, F., Ling, N. and Guillemin, R., β -Endorphin induces nonconvulsive limbic seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75 (1978) 5221-5225.
- Hong, J.S., Kanamatsu, T., McGinty, J.F., Obie, J., Dyer, R.S. and Mitchell, C.L., Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity in rat hippocampus. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 44 (1985) Abstr. 86.

- 22 Ikonomow-Turski, C., Cavalheiro, E.A., Turski, W.A., Bertolotto, Z.A. and Turski, L., Convulsant action of morphine, [D-Ala², D-Leu⁵]-enkephalin and naloxone in the rat amygdala: electroencephalographic, morphological and behavioural sequelae, *Neuroscience*, 20 (1987) 671-686.
- 23 Joy, R.M., The effects of neurotoxicants on kindling and kindled seizures, *Fundament. Appl. Toxicol.*, 5 (1985) 41-65.
- 24 Kanamatsu, T., Obie, J., Grimes, L., McGinty, J.F., Yoshikawa, K., Sabol, S. and Hong, J.S., Kainic acid alters the metabolism of Met-enkephalin and the level of dynorphin A in the rat hippocampus, *J. Neurosci.*, 6 (1986) 3094-3102.
- 25 Khachaurian, H., Lewis, E., Skhafev, K.H. and Watson, S., Anatomy of the central nervous system opioids system, *Trends Neurosci.*, March (1985) 111-118.
- 26 König, J.F.R. and Klippel, R.A., *The Rat Brain. A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem*, Krieger, New York, 1963, 162 pp.
- 27 LeGall LaSalle, G., Calvino, B. and Ben-Ari, Y., Morphine enhances amygdaloid seizures and increases interictal spike frequency in kindled rats, *Neurosci. Lett.*, 6 (1977) 255-260.
- 28 McGinty, J.F., Kanamatsu, T., Obie, J., Dyer, R.S., Mitchell, C.L. and Hong, J.S., Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity but decreases dynorphin-A-like immunoreactivity in rat hippocampus, *Neurosci. Lett.*, 71 (1986) 31-36.
- 29 Naranjo, J.R., Jadarola, M.J. and Costa, E., Changes in the dynamic state of brain proenkephalin-derived peptides during amygdaloid kindling, *J. Neurosci. Res.*, 16 (1986) 75-87.
- 30 Racine, R.J., Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizures, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 32 (1972) 269-279.
- 31 Racine, R.J., Burnham, W.M., Gartner, J.G. and Levitan, D., Rates of motor seizures development in rats subjected to electrical brain stimulation: strain and interstimulation intervals effects, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 36 (1973) 553-556.
- 32 Snead, O.C. and Bearden, L.J., The epileptogenic spectrum of opiate agonist, *Neuropharmacology*, 21 (1982) 1137-1144.
- 33 Stone, W.S., Eggleton, C.E. and Berman, R.F., Opiate modifications of amygdaloid-kindled seizures in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 16 (1982) 751-756.
- 34 Tortella, F.C., Moreton, J.E. and Khazan, N., Electroencephalographic and behavioral effects of D-Ala²-methionine enkephalinamide and morphine in the rat, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 206 (1978) 636-643.
- 35 Tortella, F.C. and Cowan, A., Studies on opioid peptides as endogenous anticonvulsants, *Life Sci.*, 31 (1982) 2225-2228.
- 36 Urca, G. and Frenk, H., Intracerebral opiates block the epileptic effect of intracerebroventricular (ICV) leucine-enkephalin, *Brain Research*, 259 (1983) 103-110.
- 37 Urca, G., Frenk, H., Liebeskind, J.C. and Taylor, A.N., Morphine and enkephalin: analgesic and epileptic properties, *Science*, 197 (1977) 83-86.
- 38 Vindrola, O., Asai, M., Zubietta, M., Talavera, E., Rodriguez, E. and Linares, G., Pentyleneetetrazol kindling produces a long-lasting elevation of IR-Met-enkephalin but not IR-Leu-enkephalin in rat brain, *Brain Research*, 297 (1984) 121-125.
- 39 Vindrola, O., Briones, R., Asai, M. and Fernández-Guardiola, A., Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain, *Neurosci. Lett.*, 21 (1981) 39-43.
- 40 Vindrola, O., Briones, R., Asai, M. and Fernández-Guardiola, A., Brain content of Leu⁵- and Met⁵-enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat, *Neurosci. Lett.*, 26 (1981) 125-130.
- 41 White, J.D., Gall, C.M. and McKelvy, J.F., Enkephalin biosynthesis and enkephalin gene expression are increased in hippocampal mossy fibers following a unilateral lesion of the hilus, *J. Neurosci.*, 7 (1987) 753-759.
- 42 Yoshikawa, K., Hong, J.S. and Sabol, S.L., Electroconvulsive shock increases preproenkephalin messenger RNA abundance in rat hypothalamus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 (1985) 589-593.

1

**DETERMINACION DE IR-MET, IR-LEU-ENCEFALINA DURANTE EL
DESARROLLO Y LAS CRISIS GENERALIZADAS REPETIDAS
PRODUCIDAS POR EL KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO**

Esther Talavera¹
Imelda Omaña²
Agustina Cano¹
Miguel Asai¹
Miguel Condés²

ABSTRACT

Several published reports suggest that opioid peptides may be implicated in the epileptic process. Over the last years, one of the main objectives at our laboratory has been the study of the enkephalin's biochemistry in experimental models of epilepsy. Repetitive and low intensity electric stimulation of the cerebral amygdala gives rise to progressive electroencephalographic and behavioral changes that culminate with generalized seizures. This experimental model of epilepsy, known as kindling, allows the study of biochemical shifts associated with the epileptization process.

This paper describes the changes in the cerebral concentrations of methionine and leucine enkephalin during the repetitive generalized seizures and its development, as well as the possible permanency effect along the amygdaloid electric kindling in the rat. Six groups of experimental animals were studied: control (C), sham-operated (FO), developmental phase (2-3), first generalized seizure (1 CG), 10 consecutive generalized seizures (10 CG), and 10 generalized seizures sacrificed 21 days after the last stimulus (PERM). The structures analyzed were: the striatum, the amygdala, the hypothalamus, the hippocampus, the midbrain, the cerebral cortex, the brainstem, and the spinal cord. Both enkephalins were measured by radioimmunoassay (RIA).

The levels of leu-enkephalin showed a progressive and significant increase from group 2-3 to the last one. These changes were related to the excitability increments during the kindling process. Within the midbrain, this peptide was decreased in the groups 1CG and PERM. The same effect was observed in the cortex of group 1CG. The concentrations of met-enkephalin at the amygdala were augmented in groups 2-3, 1CG, 10CG and PERM; meanwhile, an increase at the hypothalamus and the hippocampus was evident only in the 10CG group. A reduction of this peptide was present in the striatum of the 10CG and PERM groups, and in the brainstem of 2-3 and 10CG ones. Neither of the peptides showed significant changes at the spinal cord. The results indicate that there are independent regional variations on the concentrations of each peptide, and that these changes are related to the evolution of the kindling process.

RESUMEN

En diferentes reportes en la literatura se sugiere que los péptidos opioides endógenos participan en el proceso de la epilepsia. Uno de los objetivos principales en nuestro laboratorio, en los últimos años, ha sido el estudio de la bioquímica de las encefalinas en diferentes modelos experimentales de epilepsia. La

1. Laboratorio de Análisis Químicos.
2. Departamento de Neurofisiología, División de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calz. México Xochimilco 101, Tlalpan 14370, México, D.F.
3. Coordinación de Estudios de Postgrado, Investigación y Desarrollo Académico, ENEP-Zaragoza, UNAM, México, D.F.

estimulación eléctrica repetida de baja intensidad, de la amígdala cerebral, produce cambios electroencefalográficos y conductuales progresivos que culminan con crisis generalizadas. Este modelo experimental de epilepsia, llamado kindling, permite estudiar los cambios bioquímicos concomitantes al desarrollo del proceso de epileptización.

En este trabajo se describen los cambios que se producen en las concentraciones de metionina y leucina encefalina, en las estructuras cerebrales de la rata durante el desarrollo, las crisis motoras generalizadas repetidas y el posible efecto de permanencia a lo largo del kindling eléctrico amigdalino. Los animales de experimentación se dividieron en 6 grupos: control (C), falso operado (FO), desarrollo (fase 2-3), primera crisis generalizada (1CG), 10 crisis consecutivas generalizadas (10 CG) y animales con 10 crisis generalizadas y sacrificados 21 días después del último estímulo (PERM). Las estructuras analizadas fueron: estriado, amígdala, hipotálamo, tallo cerebral, hipocampo, cerebro medio, corteza cerebral y médula espinal. La cuantificación de ambas encefalinas se lleva a cabo por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

Los resultados obtenidos muestran que en la amígdala y en el hipocampo aumentan progresiva y significativamente las concentraciones de leu-encefalina desde el grupo 2-3. Estos cambios se relacionan con el incremento de la excitabilidad durante el proceso del kindling. En el cerebro medio disminuye la concentración de dicho péptido en los grupos 1CG y PERM. Este mismo efecto se observa en la corteza en el grupo 1CG. La cuantificación de Met-encefalina en la amígdala aumentó en los grupos 2-3, 1CG, 10CG y PERM. En el hipocampo y en el hipotálamo aumentó únicamente en el grupo 10CG. Asimismo disminuyó la concentración en el estriado en los grupos 10CG y PERM; en el tallo cerebral, en los grupos 2-3 y PERM. En la médula espinal, los cambios no fueron significativos en ninguno de los dos péptidos. Los resultados muestran variaciones regionales independientes en las concentraciones de cada uno de los péptidos y se relacionan con la evolución del proceso del kindling amigdalino.

INTRODUCCION

Este trabajo es el resultado de la cooperación entre el Laboratorio de Análisis Químicos y el Departamento de Neurofisiología de la División de Neurociencias del IMP. El Laboratorio de Análisis Químicos, desde el punto de vista bioquímico, y el Departamento de Neurofisiología, desde el punto de vista electrofisiológico y conductual, colaboraron para llevar a cabo este proyecto de investigación en forma conjunta. A partir del descubrimiento de las encefalinas en los años 70 diversos grupos de investigación han desarrollado una intensa actividad para dilucidar cuál es el papel que desempeñan estos péptidos endógenos en la epilepsia.

Las primeras evidencias de que los péptidos opioides participan en los procesos epilépticos fueron obtenidas mediante experimentos farmacológicos en los que se mostró que la inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de morfina, encefalinas o Beta-endorfina produce alteraciones electroencefalográficas características de la actividad epiléptica, así como conductas convulsivas tales como las mioclonías, las sacudidas de perro mojado y automatismos (6, 12, 23, 27). Estos mismos efectos se producen cuando se utilizan análogos de las encefalinas, tales como la D-ala-leucina encefalina o la D-ala-metionina encefalina, las cuales presentaron, además, efectos más duraderos debido a su mayor estabilidad metabólica (9, 13, 25, 26).

Por otro lado, se ha demostrado que la microinyección de morfina y los péptidos opioides en el tálamo, en el hipocampo, en la amígdala, en el núcleo caudado y en el acúmbens, producen también alteraciones electroencefalográficas de tipo epiléptico, sin llegar a desencadenar crisis generalizadas (5, 13, 17, 24). Los efectos producidos por los péptidos opioides, por los análogos de éstos, así como por los opiáceos, en algunos casos pueden ser bloqueados por la aplicación sistémica de naloxona (8, 12, 13, 25). En un reporte reciente, Cain y Corcoran (4) encontraron que la aplicación de inyecciones locales repetidas de metionina encefalina y B-endorfina en la amígdala posterior y en el hipocampo ventral, en dosis subconvulsivas, llevó a la aparición de crisis generalizadas [efecto kindling]. La aplicación de morfina en estas mismas condiciones produjo un fenómeno de tolerancia. La naloxona bloqueó las crisis producidas por los opioides.

Los estudios bioquímicos en los que se utilizan modelos experimentales de epilepsia, han proporcionado evidencias que apoyan la hipótesis de que las encefalinas están involucradas en este proceso. Un modelo de epilepsia experimental es el kindling o encendido que fue descrito por Goodard (11), el cual se induce aplicando estimulaciones eléctricas repetidas, subconvulsivas, en ciertas áreas cerebrales, principalmente límbicas, con un intervalo entre la estimulación que puede ser desde 15 minutos hasta 15 días. La aplicación inicial de la estimulación provoca posdescargas de corta duración; la amplitud de las espigas que la constituyen es baja y existe poca o ninguna propagación hacia otras regiones cerebrales. Asimismo los cambios conductuales concomitantes con las posdescargas son discretos al inicio del kindling, pero cuando los estímulos se aplican repetidamente, se incrementa progresivamente la intensidad de las respuestas

electrofisiológicas y conductuales. El kindling puede también producirse químicamente, por medio de la administración repetida de dosis convulsivantes o subconvulsivantes de varios agentes, como el carbacol, la cocaína, la lidocaína, el pentilentetrazol y otros (14, 18, 19, 32).

En trabajos iniciales de nuestro grupo, utilizando el kindling eléctrico amigdalino (KEA), se llevaron a cabo los primeros estudios en los que se demostró que los niveles de leucina y metionina encefalina se incrementan en ambos hemisferios del cerebro de la rata. Mientras que el aumento del primer pentapéptido aparece en las primeras etapas del proceso epiléptico (previo a la ocurrencia de crisis generalizadas), el incremento del segundo se produce sólo después de 5 o más convulsiones (28, 29). McGinty y col. (16) reportaron que los niveles de inmunoreactividad (IR) a la metionina encefalina se incrementaron en un 43% en el hipocampo de las ratas sacrificadas 24 horas después de producirse 2 crisis generalizadas consecutivas. En el hipotálamo, en el estriado, en la corteza frontal y en el cerebro medio no se detectaron modificaciones. Además, determinaron que cuatro semanas después de haberse producido el kindling amigdalino, la concentración de metionina encefalina había regresado a los valores control.

Con el kindling químico con pentilentetrazol (PTZ), también se produce un aumento en el contenido de ambos pentapéptidos 24 horas después de la última aplicación de la droga, así como un efecto de larga duración (15 días) para la Met-encefalina, pero no para la Leu-encefalina (30, 31). Tomando en cuenta estos antecedentes y con la finalidad de conocer la distribución regional cerebral de las encefalinas y los cambios que ocurren durante la propagación, establecimiento y permanencia del kindling amigdalino, decidimos llevar a cabo el presente estudio.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 250 a 300 g de peso, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y luz (23 ± 1 °C, con 12 horas de iluminación comenzando a las 6:00 hr), con agua y alimento ad libitum. Se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso) y se les colocó un electrodo bipolar concéntrico de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas de Albe-Pessard (2) (anterior 5.8; lateral 4.5; altura 2.5). El electrodo se colocó en la amígdala con la ayuda del registro de la actividad eléctrica bajo el criterio de la actividad espontánea y de los potenciales evocados a la estimulación olfativa. Los electrodos y el conector se fijaron en el cráneo por medio de dos tornillos embebidos en acrílico dental. El procedimiento se llevó a cabo para todos los grupos de animales a excepción del grupo control. La estimulación eléctrica amigdalina se inició una semana después de haberse practicado la cirugía. Se les estimuló dos veces al día: una vez entre las 9:00 y las 10:00 am, y la segunda vez entre las 14:00 y las 15:00 horas. Se emplearon los siguientes parámetros de estimulación: un tren de 1 seg de duración a una frecuencia de 60 Hz., con pulsos de 1 msec de duración, a una intensidad de 80 a 140 μ A. La búsqueda de la intensidad umbral se llevó a cabo aplicando estímulos de intensidad creciente a intervalos de 5 minutos. La estimulación inicial fue de 70 μ A, la cual se aumentó de 10 μ A en 10 μ A. La evolución del kindling se evaluó por la duración de las posdescargas y por la conducta de los animales. Para evaluar la conducta se utilizaron los criterios definidos por Racine (21), que consisten en: fase 1, movimientos faciales y de la boca; fase 2, movimientos verticales de la cabeza; fase 3, miclonías de los miembros anteriores; fase 4, postura de sentado con extensión del cuerpo en posición vertical; fase 5, levantamiento repetido sobre las patas traseras y caída.

Para su estudio los animales estuvieron divididos en 6 grupos: 1o. control (CO), 50 ratas machos sanas que no recibieron ningún tratamiento. 2o. Falso operado (FO): 10 ratas que fueron implantadas crónicamente en la amígdala izquierda. Este grupo no recibió ninguna estimulación eléctrica. 3o. Durante el desarrollo del kindling (fase 2-3), este grupo de 10 ratas fue implantado como el anterior y se estimuló la amígdala izquierda hasta llegar al estadio 2-3 descrito por Racine (21). 4o. Primera crisis generalizada (1CG), 10 ratas implantadas que se estimularon hasta presentar la primera crisis generalizada (fase 5). 5o. Diez crisis generalizadas (10CG), diez ratas fueron implantadas, y se les estimuló hasta presentar al menos diez crisis motoras generalizadas (fase 5). 6o. Permanencia (PERM), grupo implantado y estimulado al igual que el grupo 10GS, pero que se sacrificó 21 días después de haber presentado la décima crisis generalizada. Los grupos 2-3, 1CG y 10CG se sacrificaron 24 horas después de haber recibido la última estimulación eléctrica. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, inmediatamente después, se sacó el cerebro y se hizo la disección de las estructuras siguientes: estriado, hipocampo, hipotálamo, cerebro medio y corteza, por el método de Glowinski e Iversen, con algunas modificaciones (10, 31). La amígdala se disecó por el procedimiento de Engel (4). La disección de la médula espinal se efectuó a nivel del plexo braquial.

Posteriormente cada una de las estructuras se pesó e incubó en 4 vol. de HCl a 95°C durante 15 min. Se enfriaron en un baño de hielo, se homogeneizaron y centrifugaron a 50 000 x g durante 1 hora, a 4°C. El

sobrenadante se purificó por cromatografía de adsorción (amberlita XAD-2) a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. La cuantificación de las encefalinas se efectuó por triplicado por radioinmunoanálisis como se ha descrito previamente (31). Los resultados se expresan en picomoles/g de peso húmedo.

El antisuero de Met-encefalina mostró 100% de reactividad cruzada con Met-101-encefalina, 0.3% con Leu-encefalina, 0.2% con el heptapéptido ME-Arg-Phe-Leu, α , γ y β -endorfina. El antisuero de Leu-encefalina presentó reactividad cruzada con Met-encefalina de 3.83%, de 0.53% con ME-Arg, de 0.37% con el heptapéptido ME-Arg-Phe menos de 0.01% con Met-101-encefalina, ME-Arg-Phe-Leu y dinorfina 1-8. La reactividad cruzada con α , γ y β -endorfina fue insignificante.

RESULTADOS

Los grupos experimentales 2-3, 1CG, 10CG y PERM mostraron un desarrollo gradual y progresivo en la duración de la posdescarga (PD), así como en la evolución de las fases conductuales (figura 1), durante el proceso del kindling amigdalino. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Racine (21).

Durante cada estimulación se midió en segundos la duración de la PD provocada, y se calificó la conducta posterior al momento de la estimulación. En la tabla I se presentan los resultados obtenidos de cada grupo experimental. En los grupos fuertemente kindleados (10CG y PERM) se pudo observar un incremento progresivo de la duración de la posdescarga, así como de la intensidad de las crisis motoras generalizadas repetidas. También se observaron crisis electroencefalográficas recurrentes (figura 3). Esto es, fueron progresivamente más intensas, hasta que después de al menos 5 crisis, los animales presentaron mioclonias en las patas posteriores. Esta conducta convulsiva así como las "sacudidas de perro mojado" (WDS) no se observaron en todos los animales y su presentación fue variable. La presencia de WDS estuvo frecuentemente asociada con la parte final de las crisis motoras generalizadas (figura 3).

IR-Leu-encefalina

La cuantificación de IR-Leu-encefalina mostró que en la amígdala y en el hipocampo aumenta progresiva y significativamente la concentración de este péptido en los grupos 2-3, 1CG y 10CG. En el grupo PERM, se incrementó significativamente, aun cuando los niveles del péptido mostraron una tendencia a disminuir a niveles control (figura 2). En el tallo cerebral se observó que había disminuido su concentración desde el grupo 1CG, continuando este mismo efecto en los grupos de 10CG y PERM. Así mismo, en el cerebro medio, los niveles descendieron en los grupos 1CG y PERM. También se observó este efecto en la corteza en el grupo 1CG. El estriado, el hipotálamo y la médula espinal no presentaron modificación alguna (tabla II).

IR-Met-encefalina

La cuantificación regional de este péptido mostró que en la amígdala se produce un incremento gradual de la concentración de este péptido en los grupos 2-3, 1CG, 10CG y PERM. En los grupos 10CG y PERM únicamente aumentó en el hipocampo y en el hipotálamo. Asimismo, se observó que disminuyó en el estriado en los grupos 10CG y PERM, y en el tallo cerebral, en los grupos 2-3 y PERM. Sin embargo, en la corteza aumentó significativamente en los grupos 1CG y 10CG. En la médula espinal no se observó ninguna modificación (Tabla III).

DISCUSION

Como modelo experimental de epilepsia, el kindling nos permitió observar en diferentes grupos, la evolución conductual, electroencefalográfica y bioquímica de las diferentes etapas epilépticas. Nuestros resultados electroencefalográficos y conductuales están de acuerdo con los reportados por otros autores (3, 21, 22). Es interesante señalar que el animal kindleado presenta una variabilidad para alcanzar la primera crisis convulsiva generalizada. - Esto puede deberse a pequeñas diferencias en la localización del electrodo dentro del complejo amigdalino. De cualquier manera, nuestros grupos de ratas fueron cuidadosamente seleccionados para obtener grupos homogéneos en sus características epilépticas. Durante las crisis repetidas en los grupos fuertemente kindleados (10CG y PERM) fue posible observar tanto incrementos en la duración de las PDs como en la intensidad de las crisis motoras generalizadas. Esto nos permitió observar, en algunos casos, mioclonias de los miembros posteriores, y nos indicó que después de la primera crisis generalizada el fenómeno de epileptización continúa entre los grupos 1CG y 10CG.

La cuantificación de los niveles de encefalinas muestra que el KEA produce cambios en la concentración de estos péptidos, que están relacionados con el desarrollo, estabilización y permanencia de este fenómeno. Asimismo, estas modificaciones no siempre se presentan para ambos péptidos en la misma estructura ni durante la misma fase. La cuantificación de la Leu-encefalina mostró que en la amígdala y en el hipocampo aumenta progresivamente este péptido en los grupos 2-3, 1CG, 10CG y PERM, es decir que durante las fases de desarrollo, en las crisis únicas, en las crisis repetidas y en la permanencia del kindling, estos resultados coinciden con los reportados por Vindrola (28), quien reportó que la Leu-encefalina aumenta progresivamente en los hemisferios cerebrales de la rata, durante el desarrollo del kindling.

Sin embargo, en estructuras como el tallo cerebral en los grupos 1CG, 10CG y PERM, en el cerebro medio de los grupos 1CG y PERM, así como en la corteza del grupo 1CG, disminuyen los niveles de leucina encefalina. Se observó que la Met-encefalina aumentó gradualmente en la amígdala, a lo largo del desarrollo del kindling, y en estructuras como el hipocampo y el hipotálamo solamente aumentó en el grupo 10CG. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Vindrola (28), quien encontró que los niveles de Met-encefalina se modifican solamente después de varias crisis generalizadas. McGinty (16) también encontró que en el hipocampo, los niveles de Met-encefalina aumentan después de varias crisis generalizadas repetidas. Sin embargo, no detectó ninguna modificación en el hipotálamo, en el estriado, en el cerebro medio ni en la corteza frontal. Estos últimos resultados difieren de los nuestros, pues en el estriado los niveles de metionina encefalina descendieron en los grupos 10CG y PERM, así como en el tallo cerebral en la fase 2-3 y PERM.

Estos datos indican que los incrementos en los niveles de las encefalinas, en los animales sometidos al kindling amigdalino, ocurren, fundamentalmente, en áreas del sistema límbico. Los decrementos en los niveles de las encefalinas (en el estriado, en el tallo cerebral, en el cerebro medio y en la corteza) podrían estar relacionados con estructuras cuya función es motora y, de esta manera, contribuir a la expresión de las crisis generalizadas. Es decir, tendrían un efecto desinhibitorio. Ahora bien, el papel funcional de los péptidos endógenos no es claro, ya que han sido asociados con diferentes funciones, tales como la analgesia, la epilepsia, la catatonía, el aprendizaje, la memoria, etc., y su distribución a lo largo del SNC es muy extensa (1, 7, 15).

Por otro lado, las diferencias encontradas en ambos péptidos nos permite sugerir que el recambio es diferente en cada una de las encefalinas, dependiendo de la estructura analizada. Finalmente, estos resultados sugieren que las encefalinas pueden participar en el desarrollo y en la instalación de un fenómeno epiléptico, así como en algunas etapas de las crisis convulsivas, además de mostrar un efecto regional y diferencial con cada péptido estudiado.

REFERENCIAS

1. AKIL H, WATSON SJ, YOUNG E, LEWIS ME, KHACHATURIAN H, WALKERS JM: Endogenous opioids: Biology and function. Ann Rev Neurosci, 7: 223-255, 1984.
2. ALBE-PESSARD D, STUTINSKY F, LIBOUBAN S: Atlas Stereotaxique du Diencephale du Rat Blanc. Editions du CNRS, Paris, 1971.
3. ALBRIGHT PS, BURNHAM WM, OKASAKI M: Effect of atropine sulfate on amygdaloid kindling in the rat. Exp Neurol, 66: 409-412, 1979.
4. CAIN DP, CORCORAN ME: Intracerebral B-endorphin, Met-enkephalin and morphine: kindling of seizures and handling induced potentiation of epileptiform effect. Life Sci, 34: 2535-2542, 1984.
5. ELAZAR Z, MOTLES E, ELY Y, SIMANTOVY E: Acute tolerance to the excitatory effect of enkephalin microinjections in to hippocampus. Life Sci, 24: 541-548, 1979.
6. ENGEL J JR, SHARPLESS MS: Long-lasting depletion of dopamine in rat amygdala induced by kindling stimulation. Brain Res, 136: 381-386, 1977.
7. FREDERICKSON RCA, GEARY LE: Endogenous opioid peptides: review of physiological, pharmacological and clinical aspects. Progress in Neurobiology, 19: 19-69, 1982.
8. FRENK H, URCA G, LIEBESKIND JC: Epileptic properties of leucine and methionine enkephalin comparison with morphine and reversibility by naloxone. Brain Res, 147: 327-337, 1978.
9. FRENK H, WATKINS LR, MILLER J, MAYER JD: Nonspecific convulsion are induced by morphine but not D-alanine-methionine-enkephalinamide at cortical sites. Brain Res, 299: 51-59, 1984.
10. GLOWINSKI J, IVERSEN LL: Regional studies of catecholamines in the rat brain. J Neurochem, 13: 655-669, 1966.

11. GODDARD GV, MC INTYRE DC, LEECH CK: A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. Exp Neurol, 25: 295-330, 1969.
12. HENRIKSEN SJ, BLOOM EF, MCCOY F, LING N, GUILLEMIN R: B-endorphin induces nonconvulsive limbic seizures. Proc Natl Acad Sci, 75: 5221-5225, 1978.
13. IKONOMIDOU-TURESKI C, CAVALHEIRO EA, TURESKI WA, BOBTOLOTTO ZA, TURESKI L: Convulsant action of morphine, D-fala, D-leu-enkephalin and naloxone in the rat amygdala: Electroencephalographic, Morphological and Behavioral Sequelae. Neuroscience, 20: 671-686, 1987.
14. ITO T, HORI M, YOSHIDA K, SHIMIZU M: Effect of anticonvulsants on seizure developing in the course of daily administration of pentetrazol rats. Europ J Pharmacol, 45: 165-172, 1977.
15. KHACHATURIAN H, LEVIE E, SKHAFEV KH, WATSON S: Anatomy of the central nervous system opioids system. Trends in Neurosciences, 111-114, marzo, 1985.
16. MCGINTY JF, KANAMATSU T, OBIE J, DYERS BS, MITCHELL LC, HONG JS: Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity but decreases dynorphin-A-like immunoreactivity in rat hippocampus. Neurosci Lett, 71: 31-36, 1986.
17. NEAL H, KEANE PE: The effect of local microinjection of opiates and enkephalins into the forebrain on the electrocorticogram of the rat. Electroen Clin Neurophysiol, 45: 635, 1978.
18. POST BM, KOPANDA BT, LEE A: Progressive behavioral changes during chronic lidocaine administration: relationship to kindling. Life Sci, 17: 943-950, 1975.
19. POST BM, KOPANDA BT: Cocaine, kindling and psychosis. Amer J Psychiat, 133: 627-634, 1976.
20. RACINE RJ: Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. after-discharge threshold. Electroenceph Clin Neurophysiol, 32: 269-272, 1972.
21. RACINE RJ: Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor Seizure. Electroencephalog Clin Neurophysiol, 32: 281-294, 1972.
22. RACINE RJ, BURNHAM WM, GABTWER JG, LEVITAN D: Roles of motor seizures development in rats subjected to electrical brain stimulation: strain and interstimulation intervals effects. Electroencephalog Clin Neurophysiol, 36: 553-556, 1973.
23. SWEAD OC III, BEARDEEN LJ: The epileptogenic spectrum of opiate agonists. Neuropharmacology, 21: 1137-1144, 1982.
24. SPRICK V, ORTZI MS, ORNSTEIN K, HUSTON HP: Spreading depression induced by microinjection of enkephalin into hippocampus and neocortex. Brain Res, 210: 243, 1981.
25. TORTELLA FC, MORETON JE, KHAZAN N: Electroencephalographic and behavioral effects of D-ala-methionine-enkephalinamide and morphine in the rat. J Pharm Exp Ther, 206: 633-643, 1978.
26. TORTELLA FC, COVAN A, ADLER WM: Comparison of anticonvulsant effect of opioids peptides and ethorphine in rats after ICV administration. Life Sci, 10: 1039-1045, 1981.
27. URCA G, FRENK H, LIEBESKIND JC, TAYLOR AN: Morphine enkephalin: analgesic and epileptic properties. Science, 197: 83-85, 1977.
28. VINDROLA O, BRIONES E, ASAI M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Amigdaloid kindling enhances the enkephalin content in rat brain. Neurosci Letters, 21: 39-43, 1981.
29. VINDROLA O, BRIONES E, ASAI M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Brain content of Leu and Met-enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat. Neurosci Letter, 26: 125-130, 1981.
30. VINDROLA O, ASAI M, ZUBIETA M, LIMARES G: Brain content of immunoreactive leu-enkephalin and met-enkephalin after pentylenetetrazol-induced convulsions. Eur J Pharm, 90: 85-89, 1983.
31. VINDROLA O, ASAI M, ZUBIETA M, TALAVERA E, RODRIGUEZ E: Pentylenetetrazol kindling produces a long lasting elevation of IR-Met enkephalin but not IR-Leu-enkephalin in rat brain. Brain Res, 297, 121-125, 1984.
32. VOSU H, WISE BA: Cholinergic kindling in the rat: comparison of caudate, amygdala and hippocampus. Behav Biol, 13: 491-495, 1975.

TABLA 1

FASES CONDUCTUALES Y DURACION DE LA POSTDESCARGA DURANTE EL KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO

GRUPO	NUM. DE ESTIMULACIONES	P.D.	FASE	NUM. CCG
2 - 3	5	57.75 ± 8.78	2 - 3	0
1 CG	14.5 ± 1.37	55.33 ± 6.24	5	1
10 CG	24	80.00 ± 11.36	5	10 ± 2
PERM	24	97.25 ± 7.67	5	10 ± 2

CADA UNO DE LOS GRUPOS ESTUVO CONSTITUIDO POR UN PROMEDIO DE 8 A 10 NATAS. LAS FASES CONDUCTUALES FUERON CALIFICADAS DE ACUERDO A LA CLASIFICACION DE RACINE (1972). EL NUMERO DE ESTIMULACIONES Y LA DURACION DE LA POSTDESCARGA REPRESENTA EL VALOR PROMEDIO ± ERROR STANDARD.

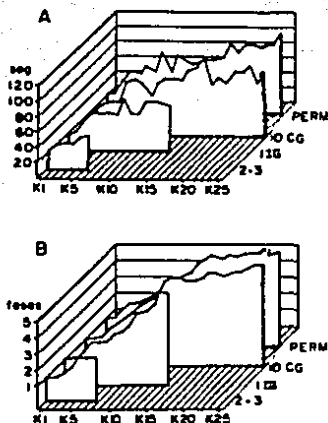


Figura 1. Muestra la duración de la postdescarga (s) la realización de los estadios conductuales (B) durante el primer del kindling en los diferentes grupos experimentales (1-3, 10, 10CL, 10CL, 10CL). Observa incremento continuo de la duración de la PD (seg.) después de la primera crisis generalizada en K15. Las abscisas indican el número de estimulaciones.

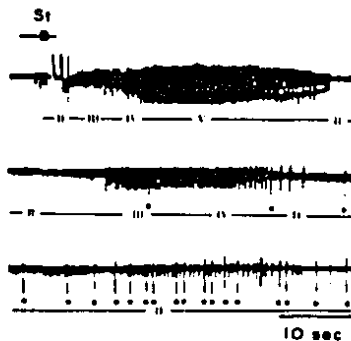


Figura 3. Registra electrográfico de la postdescarga en la amígdala de una rata del grupo 10CL. El registro corresponde a la estimulación amigdalina (St) y a la fase del kindling. La crisis electroencefalográfica estuvo acompañada por una crisis tónica bilateral generalizada. El primer trazo muestra la actividad basal, el artefacto del estímulo y la PD. El segundo trazo muestra una crisis recurrente electroencefalográfica acompañada por convulsiones autostereotípicas y actividad eléctrica recurrente. El tercer trazo muestra una crisis electroencefalográfica recurrente, ondas tónicas y actividad eléctrica recurrente. El cuarto trazo muestra la actividad eléctrica recurrente. Las abscisas indican el número de estimulaciones. 10 sec

TABLA 2

IR- LEUCINA ENCEFALINA (Pmol / g) EN EL CEREBRO DE RATA DURANTE EL KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO.

ESTRUCTURA	CONTROL	FALSO OPERADO	2 - 3	1 CG	10 CG	PERM.
ESTRIADO	352 ± 15	415 ± 31	369 ± 18	335 ± 36	314 ± 28	328 ± 26
AMIGDALA	107 ± 3	100 ± 8	147 ± 7*	164 ± 8*	220 ± 12*	146 ± 6*
HIPOTALAMO	259 ± 7	234 ± 15	240 ± 14	273 ± 29	264 ± 18	224 ± 17
TALLO CEREBRAL	107 ± 6	111 ± 12	95 ± 3	50 ± 7*	52 ± 6*	65 ± 5*
HIPOCAMPO	47 ± 4	46 ± 1	69 ± 3*	81 ± 5*	61 ± 6*	64 ± 1*
CEREBRO MEDIO	62 ± 2	58 ± 1	56 ± 2	48 ± 3 b	63 ± 3	42 ± 3*
CORTEZA	25 ± 2	24 ± 2	-----	18 ± 2 b	25 ± 1	-----
MEJILLA ESPINAL	58 ± 3	67 ± 7	49 ± 6	-----	-----	67 ± 8

CADA VALOR CORRESPONDE A LA MEDIA ± ERROR STANDARD DE 8 A 10 RATAS. LOS NIVELES DE SIGNIFICANCIA SE CALCULARON UTILIZANDO LA PRUEBA "T" STUDENT; *P<0.005, bP<0.02 COMPARADO CON EL CONTROL.

TABLA 3

IP- METIONINA ENCEFALINA (Pmol / g) EN EL CEREBRO DE RATA DURANTE EL KINDLING ELECTRICO AMIGDALINO.

ESTRUCTURA	CONTROL	FALSO OPERADO	2 - 3	1 CG	10 CG	PERM.
ESTRIADO	2013 ± 82	2144 ± 101	1860 ± 109	2047 ± 150	1524 ± 82 ^a	1532 ± 127*
AMIGDALA	329 ± 12	357 ± 48	526 ± 23*	1036 ± 87*	812 ± 64*	411 ± 43 ^b
HIPOTALAMO	718 ± 27	782 ± 84	752 ± 54	757 ± 55	926 ± 69*	604 ± 42
TALLO CEREBRAL	331 ± 8	285 ± 8	251 ± 7 ^a	302 ± 8	280 ± 9	279 ± 7 ^a
HIPOCAMPO	100 ± 4	93 ± 6	96 ± 7	120 ± 8	152 ± 15*	80 ± 5
CEREBRO MEDIO	330 ± 22	361 ± 37	379 ± 22	310 ± 17	323 ± 17	301 ± 27
CORTEZA	92 ± 7	80 ± 5	-----	131 ± 13 b	127 ± 13 b	-----
MEJILLA ESPINAL	144 ± 7	139 ± 12	-----	126 ± 2	127 ± 8	171 ± 19

CADA VALOR CORRESPONDE A LA MEDIA ± ERROR STANDARD DE 8 A 10 RATAS. LOS NIVELES DE SIGNIFICANCIA SE CALCULARON UTILIZANDO LA PRUEBA "T" DE STUDENT; *P<0.005, ^aP<0.008, ^bP<0.02 COMPARADO CON EL CONTROL.

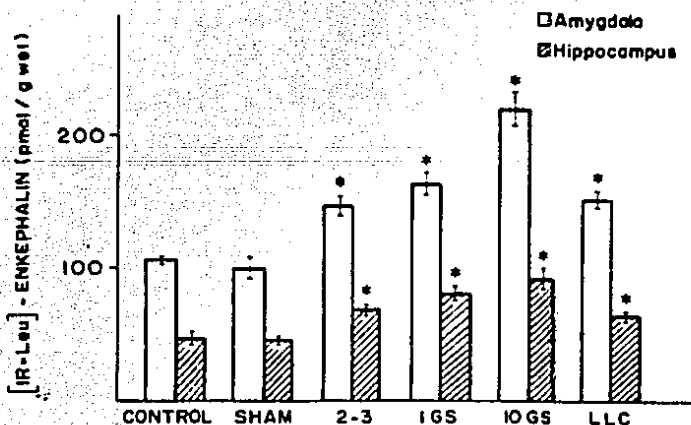


Figura 1. Muestra el incremento progresivo de la concentración de Leu-encefalina en la amígdala y en el hipocampo en los diferentes grupos experimentales. Observe el incremento significativo de la concentración en los grupos 2-3, 1CG, 10CG y la permanencia de los niveles altos en el grupo PERM.