

03081

20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSTGRADO**

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

TESIS

OPIOIDES ENDOGENOS Y PLASTICIDAD NEURAL EN HELIX ASPERSA

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA (NEUROCIENCIAS)**

S/Resumen.

PRESENTA:

RAFAEL GUTIERREZ AGUILAR

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

SOBRE LA ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

RESUMEN

INTRODUCCION GENERAL 1

CAPITULO I. Neurobiologia de los opioides. 10
Trabajo publicado en Ciencia 43: 47-61, 1992.

TRABAJO EXPERIMENTAL

CAPITULO II. IR-Met and IR-Leu-enkephalin content in the
perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*. Seasonal
variations. 26
Trabajo publicado: Gutiérrez, R. y Asai, M. *Comp.
Biochem. Physiol.* 100C(3): 609-613, 1991.

CAPITULO III. Synaptic interactions between identified neurones of
Helix aspersa. I. Homosynaptic depression. 32

CAPITULO IV. Synaptic interactions between identified neurones of
Helix aspersa. II. Concurrent enkephalinergic and
GABAergic presynaptic inhibition. 57

DISCUSION GENERAL 73

SOBRE LA ORGANIZACIÓN DE ESTA TESIS

La INTRODUCCIÓN GENERAL tiene como función centrar al lector en el marco general del cual emanan los trabajos experimentales presentados en esta tesis (a modo de capítulos) y su articulación. Por tanto, cada trabajo experimental contiene una introducción al problema abordado en cada uno y su discusión consiguiente. De ahí que en esta introducción general remitiré al lector, cuando corresponda, a la sección pertinente que abunde en los datos señalados en esta sección para evitar repeticiones innecesarias.

El capítulo I, el trabajo de revisión "NEUROBIOLOGÍA DE LOS OPIOIDES", fue publicado en la revista *Ciencia* 43: 47-61, 1991 y presenta un panorama general sobre los conocimientos y líneas de investigación actuales sobre los péptidos opioides. Los capítulos II, III y IV presentan los trabajos experimentales que conforman esta tesis y cada uno contiene las secciones de introducción, metodología, resultados y discusión. El capítulo II, "IR-Met and IR-leu-enkephalin content in the perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*. Seasonal Variations" fue publicado en *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 609-613, 1991. Los trabajos correspondientes a los capítulos III y IV son manuscritos que han sido enviados para su publicación.

Finalmente, en la DISCUSION GENERAL, se consideran los tres trabajos experimentales y se discuten los resultados y presentan conclusiones en su conjunto.

RESUMEN

En esta tesis se presentan una serie de estudios sobre los péptidos opioides en el ganglio neural de *Helix aspersa* que sugieren que este caracol terrestre posee un sistema encefalinérgico endógeno funcional y enfatiza a la preparación utilizada en el trabajo experimental como una herramienta metodológica extremadamente útil para el estudio de la fisiología de la plasticidad sináptica y su modulación por opioides.

El capítulo I consta de una revisión de la literatura sobre la neurobiología de los opioides. El capítulo II demuestra la presencia y cuantificación, por medio de radioinmunoensayo, de inmunorreactividad a Metionina-encefalina (ME) y Leucina-encefalina (LE). El uso de anticuerpos altamente específicos a estos péptidos nos permite sugerir la existencia de un sistema opioide endógeno funcional en este molusco.

Los capítulos III y IV corresponden a estudios electrofisiológicos en los que:

a) se identificó una sinapsis química y se determinaron los parámetros de liberación cuántica de neurotransmisor durante el registro intracelular simultáneo de las neuronas pre y postsináptica. Estos fueron: $q = 0.33 \pm 0.045$ mV \pm SEM; $m = 4.88 \pm 0.56$ (SEM) (n=19 pares).

b) se determinaron estos mismos parámetros después de la estimulación repetitiva de la neurona presináptica. Este procedimiento produce habituación o depresión homosináptica que consiste en un decremento progresivo de la amplitud de los potenciales postsinápticos, que bajo condiciones normales de liberación y después de producir una habituación profunda, se aproxima al valor de los potenciales espontáneos miniatura. El valor del contenido cuántico disminuyó progresivamente conforme avanzó la habituación ($m = 1.23 \pm 0.172$) sin haber modificaciones en q .

c) se determinaron los efectos de la ME y se compararon con otro neurotransmisor inhibitorio en vertebrados, GABA, antes y después de producir depresión homosináptica. Ambos produjeron una disminución de la liberación de neurotransmisor independientemente del estado previo de la sinapsis, es decir, antes y después de haber producido una habituación profunda, que se debe a la disminución de la probabilidad de liberación. El progreso de la habituación fue facilitado por la perfusión de ME y GABA y revertido por los antagonistas naloxona y picrotoxina.

Concluimos que:

1) Estos resultados confirman y extienden algunos estudios previos que sugieren la presencia de un sistema opioide endógeno en moluscos,

2) Nuestros resultados concuerdan con algunos estudios previos sobre contenido cuántico en otras preparaciones de vertebrados e invertebrados y difiere de la sinapsis sensoriomotora descrita en *Aplysia* ya que posee una mayor eficiencia o velocidad para movilizar el neurotransmisor sintetizado a la poza

liberable y

3) Sugerimos que el efecto de los opioides en la sinapsis descrita en este trabajo de tesis es disminuir la liberación de neurotransmisor debido a la reducción de la probabilidad de liberación, como había sido descrito en células ganglionares de vertebrado en cultivo, y no debido a la interferencia de la movilización del neurotransmisor a la poza liberable, como había sido sugerido por otros autores con experimentos en aplysia.

Si bien estos resultados apoyan la idea de la presencia de un sistema opioide endógeno funcional y su participación como modulador de la transmisión sináptica en este molusco, de forma similar a la que se observa en vertebrados, los mecanismos iónicos involucrados en la acción de estos péptidos en invertebrados necesitan ser dilucidados.

La presente descripción de una sinapsis identificada y modulada por opioides en un sistema anatómico relativamente sencillo, aporta una herramienta que consideramos extremadamente útil para el estudio de la modulación sináptica por opioides, la dependencia y la interacción de estos péptidos con otros neurotransmisores.

INTRODUCCION GENERAL

Los péptidos opioides, desde su descubrimiento, han sido motivo de numerosas investigaciones debido a que son sustancias endógenas con propiedades similares a las de la morfina.

Su existencia ha sido demostrada a lo largo de la escala filogenética y sus funciones son vastas. Sin embargo, parece haber un consenso en cuanto a los efectos celulares de estos péptidos, por lo menos en tejido nervioso de vertebrados. Los opioides inhiben la frecuencia de descarga de las neuronas en casi todas las regiones del SNC de mamíferos debido a la activación de una conductancia de la membrana al potasio (Duggan y North, 1983). Estos efectos se han descrito para los opioides agonistas μ y δ , sin embargo los agonistas κ actúan disminuyendo la conductancia al Ca^{2+} (Werz y Macdonald, 1983; Macdonald y Wertz, 1986; North, 1986) lo que da como resultado que se reduzca la salida de neurotransmisor de la terminal sináptica (Jessell e Iversen, 1977; Macdonald y Nelson, 1978; Mudge y col., 1979; Dunlap y Fischbach, 1981; Hirai y Katayama, 1988; Yuan y col., 1992). Otro mecanismo que ha sido propuesto para explicar la disminución del neurotransmisor que se libera es que los opioides reducen la disponibilidad de neurotransmisor liberable en la terminal sináptica (Tremblay y col., 1974).

Ha sido demostrado que los opioides facilitan o potencian la habituación e inhiben la potenciación o sensibilización. Los efectos que tienen estos péptidos sobre estos cambios plásticos y sobre la modulación de la información sensorial

aferente concuerdan con la idea de que éstos juegan un papel inhibitorio (Godfarb y Hu, 1976; Hardy y col., 1980; Catley y col., 1983; Velasco y col., 1984; Suzuki y col., 1987; Fernández-Guardiola y col., 1984, 1986, 1988; Rocha y col., 1991).

Provocar estos cambios plásticos ha sido un instrumento valioso para el estudio de estos péptidos sobre la excitabilidad nerviosa. La habituación es un fenómeno plástico que se presenta de manera general en el sistema nervioso, que consiste en la disminución progresiva de las respuestas bioeléctricas y conductuales a un estímulo repetitivo. Este fenómeno se presenta desde los insectos (Thorpe, 1956) hasta el hombre. En la década de los 50, los trabajos de Raúl Hernández-Peón y colaboradores (1955, 1956, 1957, 1958) "hicieron que resurgiera el interés por el estudio de la habituación de la respuesta neural" (Thompson y Spencer, 1966) y se utilizó, sobre todo, la preparación de gato espinal donde se podía estudiar la habituación de la respuesta refleja en un sistema relativamente sencillo. En 1966, Thompson y Spencer publicaron las características paramétricas de la habituación determinadas a partir de trabajos conductuales y neurofisiológicos.

Por ejemplo, en el fenómeno de habituación en la médula espinal se ha supuesto que los opioides endógenos entran en juego una vez que las interneuronas inhibitorias son "reclutadas" por estimulación iterativa, es decir, se echa a andar un mecanismo de depresión activa (Pearson y MacDonald, 1973; Fernández-Guardiola y col., 1989).

Sin embargo, los efectos de los péptidos opioides sobre la habituación en una vía o conexión monosináptica no pueden ser abordados sin contar con un modelo experimental apropiado. A la fecha, se han utilizado preparaciones de células ganglionares en cultivo para demostrar que estos péptidos disminuyen la cantidad de neurotransmisor que se libera (Macdonald y Nelson, 1978; Konishi y col., 1981; Jia y Nelson, 1987a,b). Estas preparaciones, si bien tienen la ventaja de poder circunscribir los efectos que se observan a una sola neurona, evitan que puedan expresarse interacciones sinápticas producto de la actividad sostenida.

Por otro lado, las preparaciones de moluscos -*Aplysia*, *Helix*- que poseen la enorme ventaja de contener neuronas muy grandes e identificables de individuo a individuo, no han sido utilizadas sistemáticamente para el estudio de los péptidos opioides, aunque en algunos casos, las interacciones sinápticas se conocen muy bien. Y a la fecha no ha habido reportes en los que se estudien los efectos de estos péptidos en una sinapsis y, por consiguiente, en la modulación de la transmisión sináptica en invertebrados. Sin embargo, fenómenos plásticos como la habituación y la sensibilización han sido estudiados in extenso.

En la habituación o depresión homosináptica, que consiste en el decremento de la respuesta (amplitud del potencial postsináptico) a la estimulación repetida (potencial de acción de la presinapsis), se ha demostrado que hay un incremento de la inactivación de la corriente de Ca^{2+} en la célula

presináptica conforme avanza el proceso (Klein y col., 1980; Nelson y col., 1986), que es la responsable de que disminuya la liberación de neurotransmisor (Castellucci y Kandel., 1974). Es también sabido que la movilización del neurotransmisor a la poza liberable es dependiente de la acumulación de Ca^{2+} que entra durante los potenciales de acción (Katz y Miledi, 1968; Rahaminoff, 1974) y ésta es modificada durante la habituación. En este punto, cobra especial relevancia el trabajo de Tremblay y col. (1974) en el que mostró que los opioides reducen la disponibilidad del neurotransmisor para ser liberado. Este autor mostró, en *Aplysia*, que la exposición prolongada a la morfina reduce la disponibilidad del neurotransmisor para ser liberado, tanto la movilización dependiente de la frecuencia de estimulación como la independiente de ella. Esto, sin embargo, no explica claramente el mecanismo de acción ya que la disponibilidad de neurotransmisor para ser liberado depende de múltiples factores, i.e., velocidad de síntesis, vesiculación del neurotransmisor y su transporte, maduración de las vesículas y su anclaje al citoesqueleto, la activación de enzimas de las que depende su fusión a la membrana presináptica y la exocitosis misma. Sin embargo, el concepto de movilización se puede explorar experimentalmente determinando la capacidad de una sinapsis para recuperar los niveles de liberación control después de haberse sometido a una depresión homosináptica (Christoffersen y Juel, 1979).

A partir de estos antecedentes y de trabajos previos (Gutiérrez, 1988; Gutiérrez, 1992) que sugieren que los opioides podían tener un efecto a nivel

presináptico de importancia en la transmisión sináptica en *Helix aspersa*, decidimos abordar los siguientes puntos:

a) determinar por medio de la técnica de radioinmunoensayo la presencia de péptidos opioides en el ganglio subesofágico de *Helix aspersa*. (Ver Capítulo II: IR-Met and IR-Leu-Enkephalin content in the periesophageal ganglia of *Helix aspersa*).

b) la identificación de una sinapsis química y las características de su respuesta a la estimulación repetitiva a frecuencias que produjeran depresión homosináptica. (Ver Capítulo III. Synaptic interactions between identified neurones of *Helix aspersa*. I. Homosynaptic depression).

c) los efectos de los opioides endógenos sobre la transmisión sináptica y determinar si el efecto de éstos dependía o no de la actividad previa de la sinapsis. (Ver Capítulo IV. Synaptic interactions between identified neurones of *Helix aspersa*. II. Concurrent Enkephalinergic and GABAergic presynaptic inhibition).

d) con base en el punto c), determinar si el efecto de los opioides es sobre la movilización del neurotransmisor como había sido sugerido o sobre la probabilidad de su liberación (Ver Capítulo IV).

CITAS BIBLIOGRAFICAS

Castellucci, V.C. y Kandel, E.R. A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* 71: 5004-5008, 1974.

Catley, D.M., Clarke, R.W. y Pascoe, J.E. Naloxone enhancement of spinal reflexes in the rabbit. *J. Physiol.* 339: 61-73, 1983.

Christoffersen, G.R.J. y Juel, C. Synaptic depression in *Helix pomatia*: a presynaptic model. *Comp. Biochem. Physiol.* 62A: 611-619, 1979)

Duggan, A.W. y North, R.A. Electrophysiology of opioids. *Pharm. Rev.* 35: 221-281, 1983.

Dunlap, K. y Fischbach, G.D. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J. Physiol.* 317: 519-535, 1981.

Fernández-Guardiola, A., Calvo, J.M. y Pellicer, F. Long-term synaptic potentiation and burst response increment could be due to enkephalinergic disinhibition. Experiments on the spinal cord and amygdaloid kindling. En *Kindling 3*, J.Wada, (ed.), Raven Press, New York, pp. 157-172, 1986.

Fernández-Guardiola, A., Pellicer, F. y Calvo, J.M. Sensitization and habituation in cutaneous polysynaptic pathways of the cat spinal cord. Possible role of enkephalinergic processes. *International Symposium on development and plasticity of the mammalian spinal cord. Abstr. 36 Spoleto (Perugia) Italia, 1984.*

Fernández-Guardiola, A., Pellicer, F., León-Olea, M., Asai, M. y Sánchez-Alvarez, M. Habituation and dehabituation of the spinal polysynaptic reflex responses: modification by naloxone and opiates and their anatomical correlates. *Neuropeptides* 14: 115-120, 1989.

Fernández-Guardiola, A., Rocha, L., Pellicer, F. y Gutiérrez, R. Naloxone facilitates sensory precipitation of focal and generalized seizures. Evoked potentials and power spectral analysis in the cat. *Exp. Neurol.* 101: 159-175, 1988.

Godfarb, J. y Hu, J.W. Enhancement of reflexes by naloxone in spinal cats. *Neuropharmacology* 15: 785-792, 1976.

Gutiérrez, R. Efecto de la naloxona sobre neuronas identificadas de caracol *Helix aspersa*. Tesis de grado de Maestría, U.N.A.M., 1988.

Gutiérrez, R. Effects of naloxone on membrane potential of identified neurones of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C: 425-531, 1992.

Hardy, Ch., Pankseep, J., Rossi III, J. y Zolovick, J. Naloxone facilitates amygdaloid kindling in rats. *Brain Res.* 194: 293-297, 1980.

Hernández-Peón, R. Central mechanisms controlling conduction along central sensory pathways. *Acta Neurol. Lat.* 1: 256-264, 1955.

Hernández-Peón, R., Guzmán-Flores, C., Alcaraz, M. y Fernández-Guardiola, A. Habituation in the visual pathway. *Acta Neurol. Lat.* 4: 121-129, 1958.

Hernández-Peón, R., Jouvett, M. y Scherrer, H. Auditory potentials at cochlear nucleus during acoustic habituation. *Acta Neurol. Lat.* 3: 144-156, 1957.

Hernández-Peón, R. y Scherrer, H. Habituation to acoustic stimuli in cochlear nucleus. *Fed. Proc.* 14: 71, 1955.

Hernández-Peón, R., Scherrer, H. y Velasco, M. Central influences on afferent conduction in the somatic and visual pathways. *Acta Neurol. Lat.* 2: 8-22, 1956.

Hirai, K. y Katayama, Y. Methionine enkephalin presynaptically facilitates and inhibits bullfrog sympathetic ganglionic transmission. *Brain Res.* 448: 299-307, 1988.

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

Jia, M. y Nelson, P.G. Opiate peptide receptor types on cultured mouse spinal neurons. *Peptides* 8: 559-563, 1987a.

Jia, M. y Nelson, P.G. A presynaptic locus of the action of met-enkephalin demonstrated in mouse spinal cord cultures. *Peptides* 8: 565-568, 1987b.

Katz, B. y Miledi, R. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol. (Lond.)* 195: 481-491, 1968.

Klein, M., Shapiro, E. y Kandel, E.R. Synaptic plasticity and the modulation of the Ca^{2+} current. *J. exp. Biol.* 89: 117-157, 1980.

Konishi, S., Akinobu, T. y Otsuka, M. Enkephalin as a transmitter for

presynaptic inhibition in sympathetic ganglia. *Nature* 294: 80-82, 1981.

Macdonald, R.L. y Nelson, P.G. Specific-opiate-induced depression of transmitter release from dorsal root ganglion cells in culture. *Science* 199: 1449-1451, 1978.

Macdonald, R.L. y Wertz, M.A. Dynorphin decreases voltage-dependent calcium conductance of mouse dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 377: 237-249, 1986.

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

Nelson, P.G., Jia, M. y Neale, E.A. Regulation of calcium currents and synaptic transmitter release. En: *Experimental Brain Research, Series 14*, Springer-Verlag Berlin, pp. 196-206, 1986.

North, R.A., Opioid receptor types and membrane ion channels. *TINS*, March: 114-117, 1986.

Pearson, J.A. y Macdonald, J.F. Habituation of the flexor reflex: inhibitory build-up or synaptic depression? *Brain Res.* 53: 451-454, 1973.

Rahaminoff, R. Modulation of transmitter release at the neuromuscular junction. En F.O. Schmitt and F.G. Wordon (eds.), *Modulation of transmitter release at the neuromuscular junction, The Neurosciences: Third Study Program*, Cambridge, Mass., M.I.T. Press, pp. 943-952, 1974.

Rocha, L., Fernández-Mas, R., Gutiérrez, R., Martínez, A. Pellicer, F. y Fernández-Guardiola, A. Naloxone effects on the visual evoked potentials recorded from the main and accessory visual pathways in the cat. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 15: 567-579, 1991.

Spencer, W.A., Thompson, R.F. y Neilson, D.R., Jr. Decrement of ventral root electrotonus and intracellularly recorded post-synaptic potentials produced by iterated cutaneous afferent volleys. *J. Neurophysiol.* 29: 253-274, 1966.

Suzuki, T., Oka, J.I. y Fukuda, H. In vitro studies of the effects of naloxone on the root potentials in the frog spinal cord: enkephalin-like effect on the recurrent presynaptic inhibition. *Comp. Biochem. Physiol.* 87C: 221-225, 1987.

Thompson, R.F. y Spencer, W.A. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol. Rev.* 73: 16-43, 1966.

- Thorpe, W.H. Learning and instinct in animals. London. Methuen, 1956.
- Tremblay, J.P., Schlapfer, W.T., Woodson, P.B.J. y Barondes, S.H. Morphine and related compounds: evidence that they decrease available neurotransmitter in *Aplysia californica*. *Brain Res.* 81: 107-118, 1974.
- Velasco, M., Velasco, F., Castañeda, R. y Sánchez, R. Effect of fentanyl and naloxone on human somatic and auditory-evoked potential components. *Neuropharmacol.* 23: 359-366, 1984.
- Werz, M.A. y Macdonald, R.L. Opioid peptides selective for mu- and delta-opiate receptors reduce calcium-dependent action potential duration by increasing potassium conductance. *Neurosci. Lett.* 42: 173-178, 1983.
- Yuan, X., Madamba, S. y Siggins, G.R. Opioid peptides reduce synaptic transmission in the nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.* 134: 223-228, 1992.
- Zucker, R.S. Crayfish escape behavior and central synapses. II. Physiological mechanisms underlying behavioral habituation. *J. Neurophysiol.* 35: 621-637, 1972.

CAPITULO I

NEUROBIOLOGÍA DE LOS OPIOIDES

Neurobiología de los opioides

Rafael Gutiérrez Aguilar

RESUMEN

Después de su descubrimiento, se atribuyó a los péptidos opioides toda clase de propiedades. A la fecha, se han descrito más de 40 péptidos con propiedades opioides. La necesidad de encontrar fármacos con acciones parecidas a las de la morfina (sedativas, analgésicas, psicotrópicas, supresoras del síndrome de abstinencia) sin sus efectos colaterales (constricción, hipotermia, tolerancia, dependencia) ha motivado la investigación en este campo de las neurociencias. En este trabajo se presenta un panorama general sobre los conocimientos y las líneas de investigación actuales sobre los péptidos opioides o endorfinas.

INTRODUCCIÓN

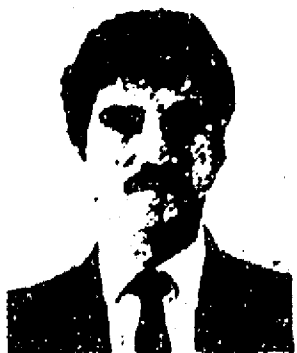
La existencia en el organismo, de receptores específicos para reconocer a la morfina, un alcaloide vegetal, sugiere la posibilidad de que éstos reconozcan una sustancia parecida a la morfina y que se encuentre normalmente en el organismo. Tal sustancia debería estar involucrada en los controles del dolor y del humor. Siguiendo este razonamiento se identificaron varios péptidos, y sus receptores, con propiedades similares a las de la morfina: los péptidos opioides o endorfinas (morfina endógena).

Desde los primeros años de la década de los sesenta, Kosterlitz propuso la existencia de una sustancia endógena con propiedades similares a las de la morfina. Pert y Snyder (1973), al describir la unión estereoespecífica de opiáceos a tejido neural, demostraron la existencia de receptores a opiáceos y, por tanto, a una sustancia que tenía que ser propia del organismo.

Hughes, entonces asociado al laboratorio de Kosterlitz, aisló del cerebro de porcino una sustancia de naturaleza peptídica a la que Kosterlitz denominó "encefalina" (*en la cabeza*). En 1975, Hughes y colaboradores determinaron la secuencia de aminoácidos de las encefalinas y posteriormente se descubrieron varios péptidos con actividades opioides (Hughes y col, 1975; Terenius y Wahlström, 1975; Guillemin y col, 1976); a todos éstos, en conjunto, se les dio el nombre de endorfinas, o morfina endógena. Los términos "opioides" y "opiáceos" se utilizan, el primero, para designar a los péptidos endógenos y el segundo para ligandos exógenos, es decir, compuestos sintéticos.

Después del descubrimiento de las endorfinas se produjeron numerosos trabajos en los que se atribuyó a estos péptidos toda clase

Recibido el 19 de agosto de 1991
Aceptado el 31 de octubre de 1991



Rafael Gutiérrez Aguilar estudió la licenciatura en psicología y la maestría en psicobiología en la Facultad de Psicología de la UNAM. Actualmente realiza su tesis para obtener el grado de doctor en investigación biomédica básica, en el área de neurociencias en la UNAM, sobre modulación sináptica por agonistas y antagonistas de los péptidos opioides. Es investigador de tiempo completo en el laboratorio de Neurofisiología de la

División de Neurociencias del Instituto Mexicano de Psiquiatría y es miembro del SNI desde 1988.

de propiedades. La necesidad de encontrar fármacos con acciones similares a la morfina (sedativas, analgésicas, psicotrópicas, supresoras del síndrome de abstinencia) sin sus efectos colaterales (constricción, hipotermia, tolerancia, dependencia) dio pie a toda clase de experimentos y especulaciones.

Este trabajo de revisión presenta un panorama general sobre los conocimientos y las líneas de investigación actuales en el campo de las endorfinas.

I. ESTRUCTURA DE LOS PÉPTIDOS OPIOIDES

La mayoría de los péptidos cerebrales que han sido examinados a la fecha (con excepción del dipéptido carnosina) son sintetizados en el ribosoma como proteínas precursoras grandes que se someten a modificaciones post-traduccionales, particularmente a proteólisis limitada. De ahí que las neuronas que utilizan péptidos como transmisores (neuronas peptidérgicas) difieren en su organización estructural de aquéllas que utilizan únicamente transmisores clásicos (Hokfelt y col, 1980; White y col, 1985). Por ejemplo, las catecolaminas (dopamina, norepinefrina), la ACh y el ácido γ -aminobutírico (GABA) se sintetizan en la terminal y el transmisor liberado puede reemplazarse ya sea por síntesis de nuevo o por recaptura del transmisor intacto en la sinapsis. En estos casos es predominante, si no es que exclusiva, la síntesis del neurotransmisor en la región terminal.

La síntesis de los péptidos se lleva a cabo únicamente en los ribosomas del cuerpo neuronal, no existe síntesis local en la terminal, que no tiene ribosomas. Probablemente el procesamiento para formar el péptido maduro y biológicamente activo ocurre en las vesículas de almacenamiento durante el transporte axónico desde el cuerpo hacia la terminal (Turner, 1984). Como no hay un mecanismo de recaptura para los neuropéptidos, cada molécula que se libera debe ser reemplazada sólo por nueva síntesis protéica y transporte axónico.

La generación de un péptido biológicamente activo, a partir de su precursor, sigue de una proteólisis limitada y controlada, catalizada por peptidasas específicas que se localizan preponderantemente en las vesículas secretoras que reconocen la secuencia de aminoácidos básicos (Lys-Arg, o una combinación de ellos) (Undenfriend y Kilpatrick,

1983). Si bien existen varias secuencias de estos aminoácidos dentro del precursor, no todas son cortadas y esto depende de los diversos tipos celulares, es decir, el primer producto de la traducción (poliproteína) puede ser procesado en forma diferente, en regiones distintas, para originar productos finales diferentes, permitiendo una diversidad de funciones de los productos de los genes de los neuropéptidos.

Mediante técnicas de DNA recombinante se han identificado los precursores protéicos de los péptidos opioides. Estos péptidos provienen de tres precursores:

- 1) de la β -endorfina/ACTH o proopiomelanocortina (POMC),
- 2) de la proencefalina A, y
- 3) de la dinofrina/neo-endorfina o prodinorfina o proencefalina B.

La POMC contiene 265 aminoácidos que contiene secuencias de varios péptidos con actividad biológica. De su procesamiento en hipófisis anterior y, principalmente en el lóbulo intermedio (que no existe en el hombre), se obtienen ACTH, (γ y α)-MSH y β -lipotropina (β -LPH). La β -LPH contiene 91 aminoácidos y no tiene actividad opioide, sin embargo, la secuencia de la β -LPH comprendida entre los residuos 61 a 91, llamada β -endorfina (β -End), es un compuesto opioide potente. La secuencia de los residuos 61 a 65 de la β -End es idéntica al péptido met-enkefalina (ME), sin embargo, este péptido opioide no se libera como producto final de la β -End. De esta manera, a partir de la β -End, se producen naturalmente la γ -endorfina (61-77) y la α -endorfina (61-76) (véase la figura 1).

La identificación de la ME como β -LPH (61-65) y de la β -End como β -LPH (61-91) hizo pensar que la β -LPH era el precursor de ambos péptidos. Aunque éste sí es el caso para la β -End, no se pudo demostrar la relación *in vivo* del precursor con la ME ya que, primero, los niveles de β -End son del 5 al 10% de los de las encefalinas (Rossier y col, 1977; Simantov y col, 1977) y segundo, la distribución regional de β -End y de encefalinas difieren considerablemente. En el cerebro hay dos grupos celulares que producen péptidos relacionados con la β -End/ACTH. El principal en los núcleos arcuato y medial basal del hipotálamo, cuyas fibras proyectan al sistema límbico y tallo y el segundo grupo en el tracto solitario y en el commisuralis (ver Akil y col, 1984). Aunque en menor proporción, también han sido encontrados en áreas como

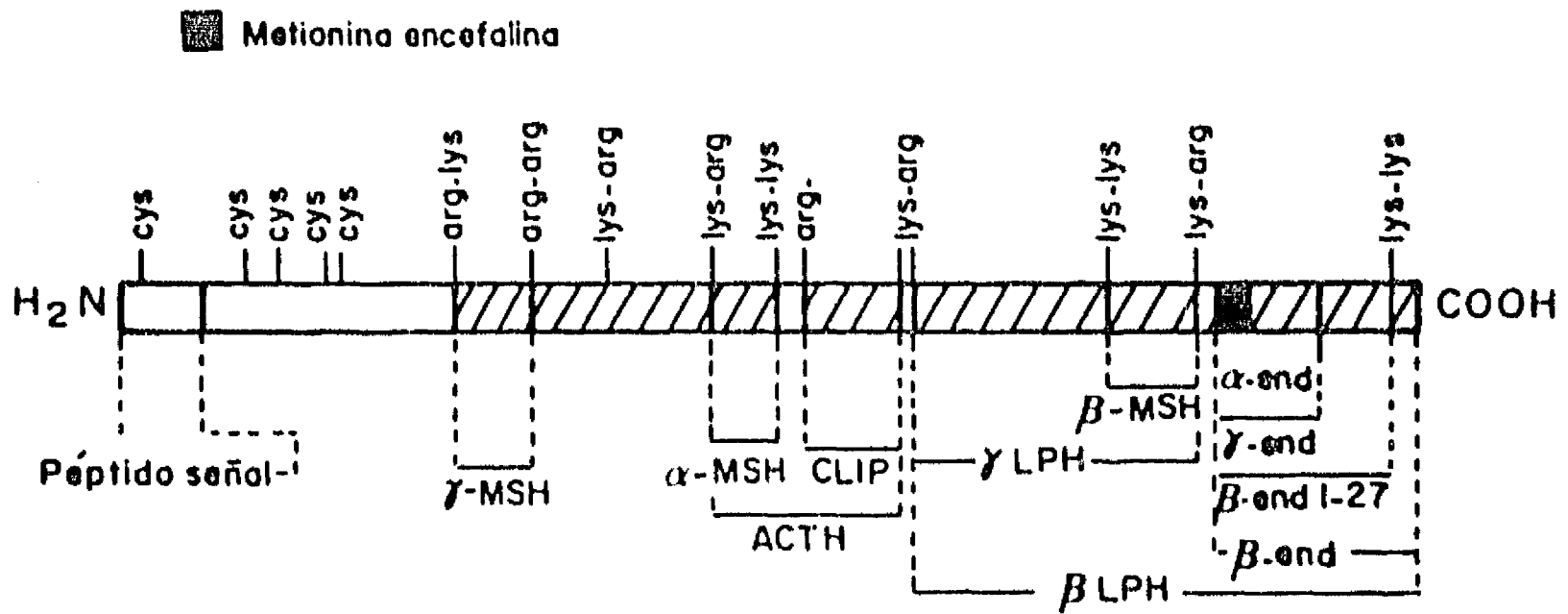


Figura 1. Productos de la proopiomelanocortina. Se señala el sitio donde se encuentra la secuencia de met-enkefalina, dentro de la secuencia de la β -endorfina. Nótese la ausencia de leu-enkefalina.

el septum, núcleo accumbens y amígdala. Por otro lado, es claro que la leu-enkefalina (LE) se sintetiza independientemente de la β -End ya que su secuencia de aminoácidos no se encuentra en la POMC.

Al contrario de la POMC, todos los péptidos producto de la proencefalina A son de naturaleza opioide y se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, desde corteza hasta la médula espinal. La proencefalina A contiene en su estructura siete péptidos con las secuencias de la ME o de la LE. Cuatro son de ME, que es un pentapéptido (Try-Gly-Gly-Phe-Met), un heptapéptido (ME-Arg⁶-Phe⁷), un octapéptido

ME-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ y una copia de LE (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) (véase la figura 2).

La presencia de ME y LE en el mismo precursor —proencefalina A— hizo suponer que ambos péptidos podían estar en la misma célula, es decir, que ambos fueran sintetizados por igual. Sin embargo, hay neuronas que muestran inmunorreactividad a LE y no a ME. En estas neuronas la secuencia de LE debe provenir de la expresión del gen para proencefalina B o prodinorfina (Turner, 1986) (véase la figura 3). La prodinorfina no contiene la secuencia para ME. Produce cinco péptidos que comienzan con la secuencia para LE y varían en longitud a partir de su terminal C, éstos son:

α -neo-endorfina	LE-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys
β -neo-endorfina	LE-Arg-Lys-Tyr-Pro
dinorfina A 1-8	LE-Arg-Arg-Ile
dinorfina A 1-17	LE-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
dinorfina B 1-13 o Rimorfina	LE-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr

La dinorfina puede servir como precursor de la LE, sin embargo, debido a sus potentes acciones opioides, es probable que tenga un papel fisiológico por sí misma. El precursor se ha encontrado en varios grupos celulares del hipotálamo, principalmente en el núcleo supraóptico, y en el tallo (Akil y col, 1984).

Además de estas tres grandes familias, existen otros agonistas con actividad opioide potente. Uno de ellos, descubierto en la piel de la rana *Phyllomedusa sauvagei* (Montecucchi y col, 1981), es un heptapéptido denominado dermorfina (H-Tyr-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂). Este heptapéptido es se-

Quiñones

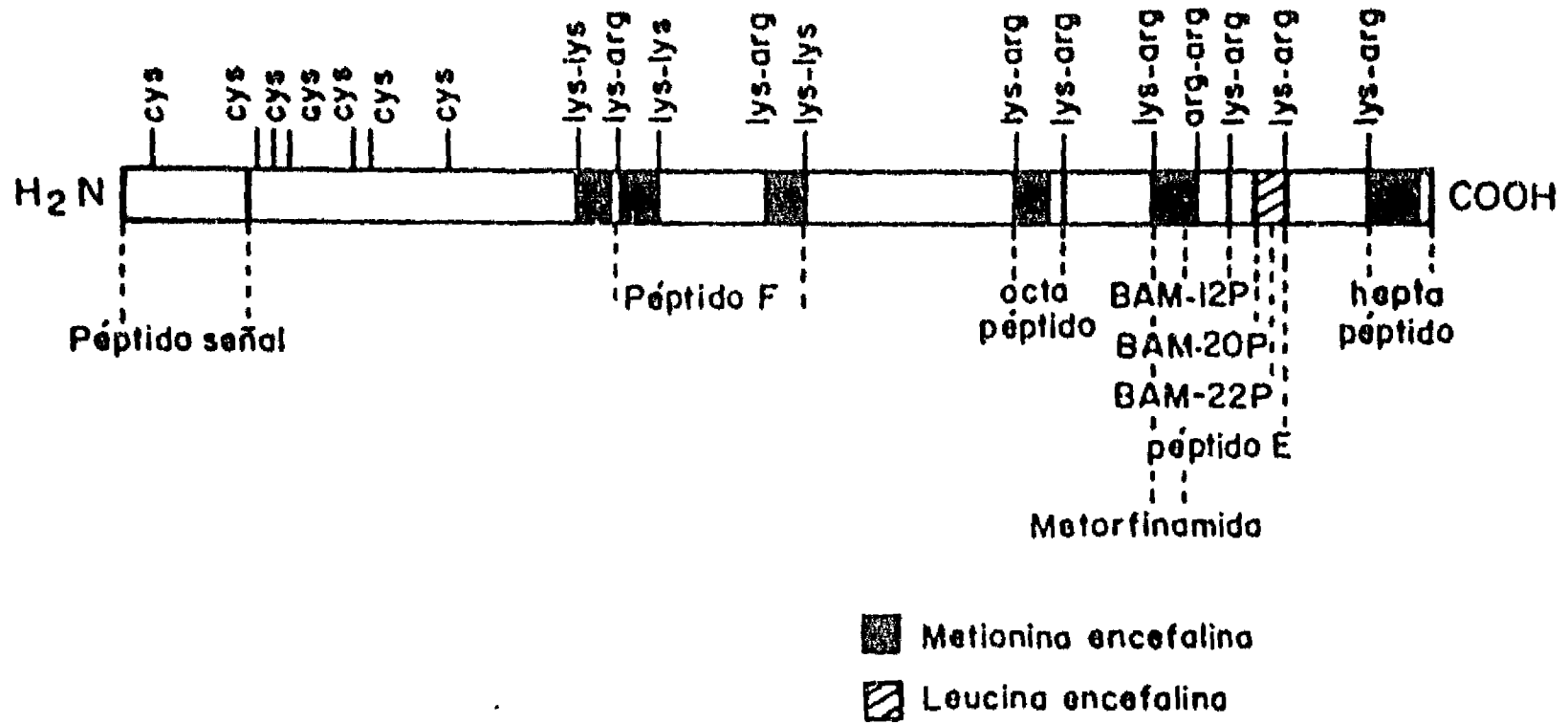


Figura 2. Productos de la proencefalina-A. Se señalan los sitios donde se encuentran las secuencias de met-encefalina y leu-encefalina.

mejante a los péptidos caseínicos, denominados "exorfinas" (Henschen y col, 1979), extraídos de la caseína de la leche.

Por otro lado, la kyotorfina es un dipéptido (Tyr-Arg) que tiene actividad opioide proba-

blemente debido a que promueve, de manera específica, la liberación de ME (Ueda y col, 1987).

El tetrapéptido carboxiterminal del heptapéptido (Me-Arg⁶-Phe⁷; véase proencefa-

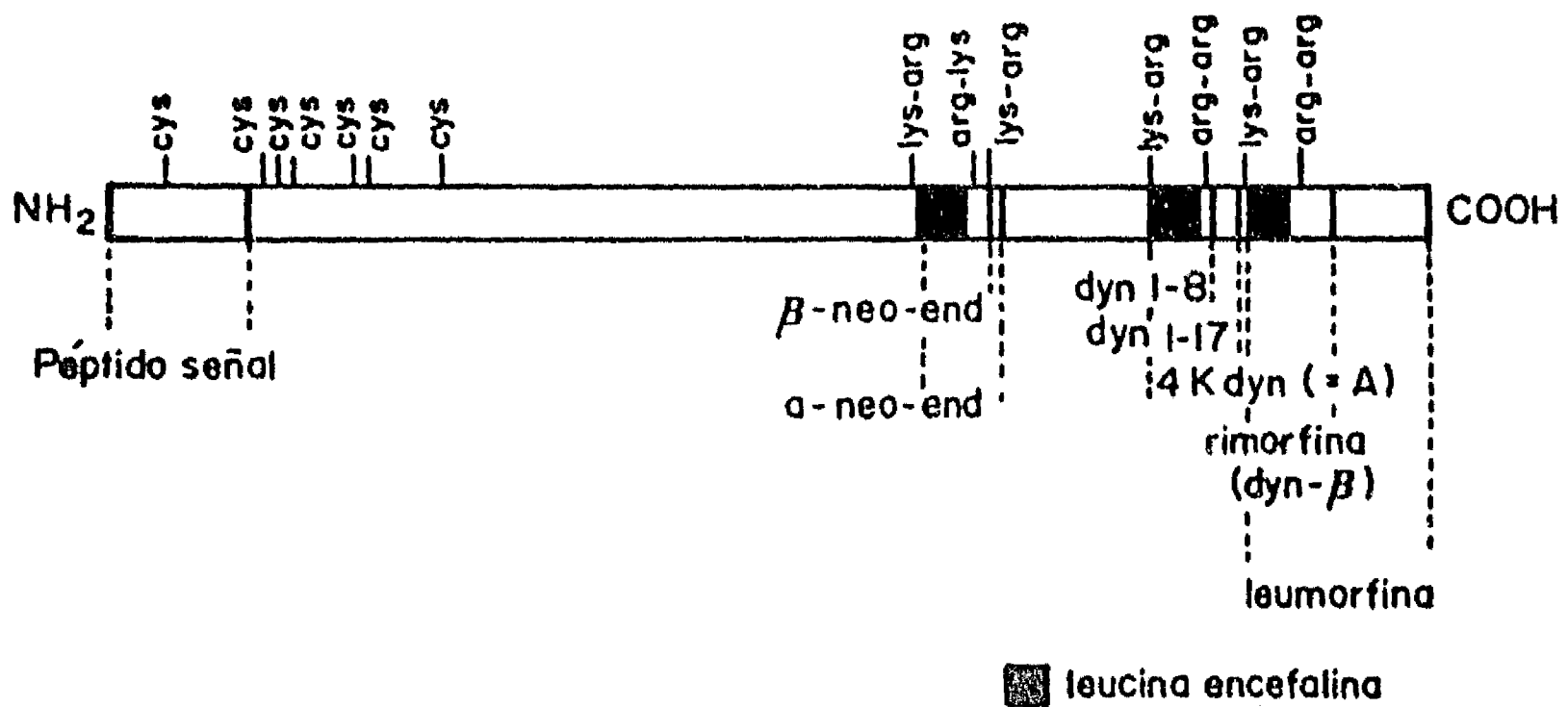


Figura 3. Productos de la prodinorfina o proencefalina B. Se señalan los sitios donde se encuentra la secuencia de leu-encefalina. Nótese la ausencia de met-encefalina.

lina A) comparte su secuencia con un péptido excitatorio con propiedades opioides de moluscos, la FMRFamida. Los anticuerpos desarrollados contra este péptido reconocen un "sistema opioide" en neuronas de mamíferos, que no corresponde con el de las tres grandes familias (Bloom, 1983).

Los neuropéptidos están concentrados particularmente en la terminal de las neuronas. Aun así, las concentraciones de los neuropéptidos en el SNC son varios órdenes de magnitud menores (10^{-12} - 10^{-15} mol mg⁻¹ proteína) que las de los neurotransmisores clásicos como acetilcolina (ACh) y monoaminas (Hokfelt y col, 1980).

El papel de las endorfinas como neurotransmisores, es apoyado por su existencia en las terminales nerviosas en forma vesiculada (Kemp y Powell, 1971) y porque pueden ser liberadas por exocitosis. Las varicosidades en las que se encuentran las vesículas no forman especializaciones sinápticas, por lo menos en los ganglios basales, por lo que estos autores sugieren que la neurotransmisión es "más difusa" que las de los neurotransmisores clásicos. Una vez liberadas, las sustancias neurotransmisoras pueden ser removidas del espacio sináptico por tres mecanismos: difusión, degradación enzimática y recaptura. La acetilcolina, por ejemplo, es removida por degradación enzimática por la acetilcolinesterasa lo que permite que la colina sea recapturada por la neurona. Los aminoácidos transmisores son removidos del espacio sináptico por las células gliales y neuronas. Para los péptidos no se ha descrito ningún mecanismo de recaptura.

En el caso de los péptidos, además de la difusión, se lleva a cabo una proteólisis lenta por peptidasas extracelulares. Estas peptidasas no son específicas, en el sentido que la acetilcolinesterasa lo es para hidrolizar a la acetilcolina.

La enzima membranal que realiza la hidrólisis de las encefalinas es la "encefalinasasa", que es una endopeptidasa membranal (Endopeptidasa-24.11) que se localiza también en riñón y que hidroliza también a la sustancia P (Taquikininas). No se sabe si esta enzima membranal se localiza en neuronas, en la glía o en ambos tipos de células.

Un metabolito de la ME, obtenido por perfusión *in vivo* (Graves y col, 1978) es Tyr-Gly-Gly, que se obtiene por hidrólisis de la unión Gly³-Phe⁴ de la encefalina y se libera

el dipéptido PHe-Met. Ambos fragmentos son biológicamente inactivos.

La inactivación de encefalinas también se da por medio de la hidrólisis de la unión Tyr¹-Gly², por acción de una aminopeptidasa. Gran parte de la actividad de esta aminopeptidasa en el cerebro se realiza en el nivel citosólico y, por tanto, no es relevante en el metabolismo sináptico de las encefalinas. Sin embargo, hay cantidades importantes de esta aminopeptidasa unidas a la membrana y el hecho de que la inhibición de la aminopeptidasa (con Bestatina) y de la endopeptidasa-24.11 (con Thiorphan) potencie la analgesia inducida por opioides, más que si se inhibe una sola de las enzimas, apoya la idea de que ambas son responsables del metabolismo extracelular de estos péptidos.

II. DISTRIBUCIÓN FILOGENÉTICA DE LOS OPIOIDES

Una forma ancestral de endorfina pudiera ser el material similar a la POMC que se caracterizó por medio de radioinmunoensayos en extractos de organismos unicelulares (Le Roith y col, 1982). Estos autores mostraron inmunorreactividad a β -End y un pico de actividad de radioligando con una K_A similar a la β -End auténtica en un eucariote unicelular (*Tetrahymena pyriformis*).

Se han determinado productos de neurosecreción inmunorreactivos a neuropéptidos de vertebrados, incluyendo a opioides, en sistema nervioso de celenterados, platelmintos, anélidos e insectos. (véase Remy, 1982; Rzasa y col, 1984; Venturini y col, 1983).

En el protocordado ascidia (*Styela plicata*) se ha observado inmunorreactividad a β -End (Pestarino, 1985). En un estudio con 11 especies de invertebrados marinos que comprende desde las esponjas, pasando por cridarios, artrópodos, moluscos y protocordados, se determinó la existencia de unión a receptor opioide de agonistas e inmunorreactividad a ME (Piccoli y col, 1985). También se corroboró la existencia de ME, LE y heptapéptido en moluscos marinos y terrestres (Leung y Stefano, 1983; Gutiérrez, 1991; Gutiérrez y Asai, 1991), endorfinas y encefalinas en peces (Kawauchi y col, 1980; Estivariz e Iturriza, 1985; Satake, 1979), encefalinas en crustáceos (Jaros y col, 1985) β -End, encefalinas y dinorfinas en reptiles (Eldred y Karten, 1985; Wolters y col, 1986; Brauth, 1984; Lindberg y White, 1986), en anfibios (Dores y Rothenberg, 1987; Kilpatrick y col, 1983; Vaudry y

col, 1984; Leboulenger y col, 1986; Martens y Herbert, 1984; Asai y col, 1988; León-Olea y col, 1991; Cone y Goldstein, 1982) y en aves (Reiner y col, 1984; Brecha y col, 1979; Bayón y col, 1980; Pert y col, 1974; Simantov y col, 1976).

III. RECEPTORES A LOS OPIOIDES

Clasificación

Los trabajos que estimularon la investigación sobre los receptores a opioides demostraron la existencia de estereoespecificidad (Becket y Casey, 1954) y la identificación de sitios de unión (receptores) a opioides en preparaciones de membrana en el SNC.

Usando una modificación de un método para medir la unión estereoespecífica de opioides en homogenados de cerebro desarrollado por Goldstein y col (1971), tres laboratorios reportaron la demostración bioquímica de sitios de unión para opioides usando ³H-naloxona (Pert y Snyder, 1973), dihidromorfina (Terenius, 1973) y etorfina (Simon y col, 1973). Estos sitios mostraron la misma estereoespecificidad que la observada en estudios farmacológicos y los compuestos no marcados inhibieron la unión con la misma potencia relativa medida en bioensayos e *in vivo*. Varios estudios conductuales subsecuentes, al usar varios agonistas opioides, sugirieron que había más de un tipo de receptor en el SNC (Martin y col, 1976; Gilbert y Martin, 1976).

Los neurotransmisores clásicos tienen receptores de varios tipos; hay muscarínicos y nicotínicos para Ach, α y β para NE y varios para DA y 5-HT. Esto también es cierto para los opioides; el primer hallazgo se hizo en perros espinales por Martin y col (1976). Las diferencias en las respuestas farmacológicas a varios tipos de analgésicos narcóticos y la imposibilidad de hacer sustituciones entre sí para evitar el síndrome de abstinencia en animales adictos llevaron a postular la existencia de al menos tres tipos de receptor en el SNC de perro. Se denominaron de acuerdo con el tipo de droga que permitió hacer la distinción: μ para los que el agonista era morfina, K para los que era cetociclazocina y σ para los que el agonista era SKF-10047.

El receptor μ se define operacionalmente como el sitio de alta afinidad en el que los opioides producen analgesia y aumentan el tono muscular, la constipación, la oliguria, y producen una fuerte depresión respiratoria e

intensa dependencia física. El receptor δ se define como aquél que se localiza en tejidos periféricos como en el *vas deferens* de ratón (Lord y col, 1977) y en el SNC (Chang y col, 1979) y que muestra mayor afinidad para las encefalinas naturales (péptidos opioides) que para la morfina. Los agonistas que "prefieren" al receptor δ tienen una actividad analgésica más débil que los que "prefieren" al μ (Shaw y col, 1978; Audigier y col, 1980; Kosterlitz y col, 1980; Ronai y col, 1981). El receptor K es en el que los opiáceos, como la cetociclazocina, producen mayor analgesia que los agonistas μ , así como efectos atáxicos y sedantes (Gilbert y Martin, 1976; Martin y col, 1976), la depresión respiratoria es menor y se presenta menor dependencia. Recientemente se ha mostrado que este receptor es altamente selectivo para la dinorfina (Chavkin y col, 1982).

Se ha propuesto que el receptor σ es el sitio en el que se median los efectos psicotomiméticos y estimulantes de la N-allylnormetazocina (SKF-10047), la ciclazocina y otros opiáceos relacionados (Martin y col, 1976; Zukin y Zukin, 1981). Los opioides σ difieren de los opioides clásicos en que producen efectos psicotomiméticos en el hombre y efectos conductuales singulares en animales (Haertzen, 1970; Holtzman, 1974). En dosis bajas producen acciones similares a las de la morfina, como analgesia (Lasagna y col, 1964) y acciones antagonistas como la precipitación del síndrome de abstinencia en sujetos adictos a la morfina (Haertzen, 1974). En dosis altas, producen una combinación de sedación, "embriaguez" y psicosis que no se parece a los efectos de la morfina (Gilbert y Martin, 1976; Martin y col, 1976). La mayoría de los efectos conductuales de los opioides σ observados en animales no se revierten con naloxona o naltrexona —antagonistas opioides no selectivos (Teal y Holtzman, 1980; Vaupel, 1983; Vaupel y col, 1986).

Más aún, estudios de unión con el receptor σ sugieren que éste puede no ser un receptor opioide típico ya que no muestra la clásica estereoespecificidad de un receptor opioide, tanto D- como L-SKF-10047 son equipotentes y se unen a los "receptores" a PCP (Akil y col, 1984).

En contraste con las acciones analgésicas de los agonistas μ , δ , K y ϵ , el agonista σ , SKF-10047, no es analgésico y sí un antagonista potente μ (Martin y col, 1976; Metcalf y col, 1979; Teal y Holtzman, 1980).

Parece que los opioides σ interactúan con

dos sitios (además de tener posibles interacciones con receptores μ , δ y K) que no son sensibles a la naloxona. Uno, es el receptor a la fenciclidina o PCP/ σ , que media los efectos psicotomiméticos de la PCP y drogas relacionadas. El otro es insensible a la PCP pero muy sensible al haloperidol y a un ligando al autorreceptor de DA.

Se sabe que una consecuencia de la unión de un agonista al receptor PCP/ σ es la modulación de los efectos del NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) en el SNC. El NMDA es el agonista prototipo del receptor a aminoácidos tipo N-excitatorios. Los derivados de la PCP, los agonistas opioides σ y las benzo-f-isquinolinas antagonizan estereoespecíficamente y potentemente la excitación producida por NMDA en neuronas espinales (Anis y col, 1983; Berry y col, 1984) y corticales (Thomson y Lodge, 1985; Thomson y col, 1985; Lacey y Henderson, 1986). Las drogas tipo PCP/ σ también antagonizan específicamente la liberación inducida por NMDA en rebanadas de cerebro (Snell y Johnson, 1985 y 1986).

Un receptor recientemente caracterizado, el ζ (Zagon y col, 1989) ha sido descrito como mediador de crecimiento celular.

Además de los agonistas puros, existen otros dos tipos de narcóticos en uso. Éstos incluyen los agonistas parciales μ (buprenorfina, profadol y propiram) y los analgésicos agonistas/antagonistas (pentazocina, ciclazocina, butorfanol, nalbufina y nalorfina) (Martin y col, 1976; Houde, 1979).

Los agonistas parciales μ , en dosis bajas, son agonistas al receptor μ ; en dosis altas son antagonistas competitivos. Esta actividad antagonista parece deberse a que tienen una tasa de disociación muy lenta del receptor μ (Cowan y col, 1977). Los analgésicos ago-

nistas/antagonistas tienen varias afinidades por el receptor (Martin y col, 1976). Éstas incluyen antagonismo a μ , agonismo para K y agonismo parcial para σ .

Tanto los agonistas μ como los K son potentes analgésicos, sin embargo, al contrario de los agonistas μ , los K : a) no son autoadministrados por monos (Woods y col, 1978); b) no suprimen el síndrome de abstinencia en perros dependientes a morfina (Martin y col, 1976) ni en monos (Woods y col, 1978) y c) no presentan o expresan tolerancia cruzada con la morfina (Martin y col, 1976; Gilbert y Martin, 1976; Tepper y Woods, 1978).

Todos los agonistas μ , δ , K y ϵ que han sido probados son analgésicos potentes. Sin embargo, esta conclusión se ve limitada por la inexistencia de un agonista δ puro (véase la tabla I).

El aislamiento de diferentes tipos de péptidos opioides endógenos y su clasificación en familias de proteínas precursoras ha llevado al intento de relacionar a estos péptidos con los distintos tipos de receptores.

Todos los péptidos relacionados con la proencefalina muestran actividad δ , desde la LE, que es principalmente δ , hasta el octapéptido, que parece ser igualmente μ y δ . La familia de las pro-dinorfinas muestran una selectividad similar. Todas las dinorfinas y neo-endorfinas prefieren a los receptores K (Chavkin y col, 1982), pero la dinorfina A (1-8) conserva cierta afinidad por el δ (Corbett y col, 1982; Akil y col, 1984) mientras que la dinorfina A (1-13) es potente tanto en μ como en K . La tercera familia, POMC, da lugar a la β -End que es muy potente en μ y δ con una preferencia por δ y al receptor ϵ , con una distribución restringida en el cerebro (Wood, 1982). Debe recordarse que la preferencia de

Tabla I

Subpoblaciones de receptores opioides y agonistas prototipo

Receptor	Agonista
μ	Morfina, dihidromorfina, fentanil
δ	DADLE (D-Ala ² -D-Leu ⁵ -Enk); DSLET (D-Ser ² -Leu ⁵ -Enk-Thr ⁶)
K	EKC (etilketazocina); MR-2034 [($-$)- α -(1R,5R,9R)-5,9-dimetil-2-(L-tetrahydrofurfuril)-2'-hidroxi-6,7-benzomorfanol]
ϵ	β -Endorfina
σ	SKF-10047 (N-alilnorfenazocina) 8-metoxiciclazocina
ζ	Met-enkefalina

Tabla II
Subpoblaciones de receptores opioides y antagonistas prototipo

Receptor	Agonista
μ	Naloxona β -funaltrexamina
δ	Naltrindole; ICI 154129
K	β -clornaltrexamina; norbinaltorfimina; Mr2266
ϵ	
σ	Metafit metanosulfonato

un opioide por un tipo de receptor es un fenómeno *in vitro* y la acción real de cualquier péptido depende del tipo de receptor presente en la sinapsis de esta neurona peptidérgica.

Regulación de los receptores a los opioides

La ocupación prolongada o repetida de los receptores por sus ligandos produce cambios en su número sin que varíe la afinidad del ligando por el receptor. En el sistema opioide, la regulación "hacia abajo" (*down regulation*), que consiste en la disminución del número de receptores ante su exposición crónica a un agonista, fue reportada por Chang y col (1982) y Law y col (1983). Esta regulación hacia abajo es dependiente de la dosis, la temperatura y el tiempo de incubación. Estas características son consistentes con un mecanismo que implique la internalización de los complejos ligando-receptor al citosol (Blanchard y col, 1982 y 1983). Estos experimentos se realizaron en preparaciones *in vitro*, en sendas líneas celulares; sin embargo, la administración crónica de morfina (agonista μ) *in vivo* no produce cambios en el número ni en la afinidad de los receptores a opioides (Pert y col, 1973; Klee y Streaty, 1974; Höllt y col, 1975). Más aún, Dingledine y col (1983) observaron regulación hacia abajo de receptores δ y no de receptores μ en el hipocampo, lo que parece indicar que la regulación hacia abajo es propiedad de los receptores δ . Sin embargo, Nakata y col (1985) demostraron la regulación hacia abajo de receptores μ y δ en áreas específicas del cerebro de rata al causarla por el shock electroconvulsivo, debido probablemente a que este procedimiento produce una liberación de opioides endógenos.

La exposición aguda de líneas celulares a agonistas opioides no tiene efectos sobre el número de receptores, en cambio, la administración crónica de antagonistas en roedores

produce un incremento en la unión ligando-receptor (Hitzeman y col, 1974; Zukin y col, 1982; Lahti y Collins, 1978; Schulz y col, 1979; Bardo y col, 1982; Neisewander y col, 1989). Este proceso, llamado regulación "hacia arriba" (*up regulation*), implica el aumento del número de receptores ante su exposición crónica a un antagonista y, en el caso de los opioides, es específico para ciertas regiones cerebrales (Zukin y col, 1982; Tempel y col, 1984).

La regulación hacia arriba puede ser causada no sólo por la ocupación del receptor por un antagonista, sino también por la falta de ocupación por su agonista. Esto fue demostrado por Gardner y col (1980) al medir un aumento en el número de receptores a opioides en la amígdala tras la lesión de la sustancia nigra con 6-hidroxidopamina. El proceso de regulación hacia arriba parece no ser específico de un receptor opioide en particular (Zukin y col, 1982).

IV. ANTAGONISTAS OPIOIDES

En 1915, con la intención de mejorar las propiedades analgésicas de la codeína, Pohl (1915) sintetizó la N-alilnorcodeína y observó un ligero antagonismo de la depresión respiratoria y del sueño producidos por la morfina; dosis muy altas producían un efecto excitatorio. En 1941, McCawley y col intentaron producir N-alil-normorfina, el congénere fenólico de la N-alilnorcodeína, con la idea de producir un analgésico sin efectos depresores de la respiración. Reportaron mayor antagonismo que la N-alilnorcodeína, sin embargo, su producto era en realidad 3(o), N-dialilnormorfina. En 1942, Weijlard y Erickson produjeron la nalorfina auténtica o pura (N-alilnormorfina) que resultó ser un antagonista potente a las acciones de la morfina (Unna, 1943; McCawley y col, 1941); otros investigadores reportaron que tenía efectos parecidos a la morfina como sus propiedades analgésicas en el hombre y en algunos animales (Pearl y col, 1969; Perrine y col, 1972) y se le vió una gran potencialidad para el tratamiento de las sobredosis de morfina (Echenoff y Elder, 1952).

Estos hallazgos impulsaron el desarrollo de antagonistas nuevos con diferentes grados (potencias) de agonismo y antagonismo, con el fin de contar con agentes potentes para el alivio del dolor, sin tener potencial de abuso.

El antagonista más usado y que se con-

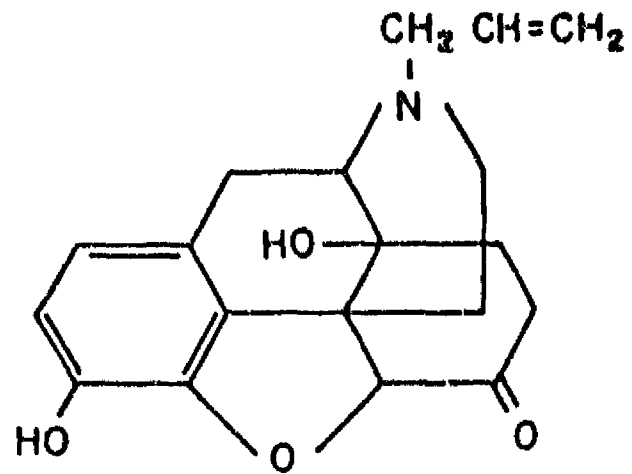
sidera "puro" es la naloxona o N-alilnoroximorfona. Este compuesto fue sintetizado por Lewenstein y Fishman en 1960 y antagoniza las acciones mediadas por los receptores μ , K y δ y ciertos efectos mediados por los receptores σ . Aunque la naloxona es capaz de bloquear todos los receptores, su afinidad no es la misma, el orden de mayor a menor afinidad es $\mu > K > \delta > \sigma$. En la actualidad se han sintetizado varios antagonistas con mayor selectividad (véase la figura 4).

V. ELECTROFISIOLOGÍA DE LOS OPIOIDES

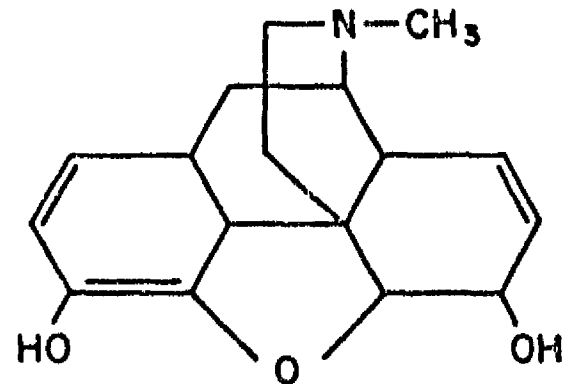
Los opioides inhiben la frecuencia de descarga de las neuronas en casi todas las regiones del SNC de mamíferos (North y Williams, 1985). Este efecto inhibitorio de la frecuencia de disparo es debida a la activación de una conductancia de la membrana al potasio como resultado de un incremento del Ca^{++} intracelular (Duggan y North, 1983). Estos efectos se han descrito para los opioides agonistas μ y δ , sin embargo, los agonistas K actúan disminuyendo la conductancia al Ca^{++} (Werz y Macdonald, 1983; Macdonald y Werz, 1986; North, 1986).

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

En 1977, Jessell e Iversen demostraron que los opioides disminuyen la liberación de la sustancia P en el núcleo trigémino de la rata. Mudge y col (1979) demostraron que la D-Ala²encefalina-amida y la encefalina decremantan la duración de los potenciales de acción cálcicos lo que se refleja en una inhibición de la liberación de sustancia P en neuronas de ganglio dorsal de pollo. Algunos estudios, en los que se ha hecho análisis cuántico (del Castillo y Katz, 1954), han demostrado que los opioides producen un decremento en el contenido cuántico en varias preparaciones (Macdonald y Nelson, 1978, en células ganglionares de ratón en cultivo; Konishi y col, 1981, en neuronas de plexo mientérico; Jia y Nelson, 1987a y b, en neuronas ganglionares de ratón en cultivo), lo que concuerda con la idea de que los opioides ejercen un efecto presináptico inhibitorio.



Naloxona



Morfina

Figura 4. Estructuras de la morfina (agonista prototipo) y la naloxona (antagonista puro).

Asimismo, Konishi y col (1981) y Cherubini y col (1988) demostraron que los opioides disminuyen la liberación de acetilcolina. Gintzler (1979 y 1980) mostró la disminución en la liberación de sustancia P y serotonina en la misma preparación y Hirai y Katayama (1988) en ganglio simpático de rana.

Además de estos efectos presinápticos de los opioides, también han sido documentados efectos postsinápticos (Bradley y Dray, 1974; Zieglgänsberger y Tulloch, 1979; Yaksh, 1981; Crain y col, 1988). La transmisión sináptica colinérgica se bloquea con la morfina en altas concentraciones (Waziri, 1976) y la LE es capaz de deprimir la amplitud de las respuestas al GABA y al glutamato (Barker y col, 1978). Tremblay y col (1974) reportaron que la morfina tiene un efecto anticolinesterásico y Duggan y col (1976) proponen que los opioides son agonistas al receptor nicotínico en las células de Renshaw.

En el hipocampo, el efecto inhibitorio sobre las interneuronas GABAérgicas es post-

Se miden los niveles de la proteína de unión a opiáceos en el hipocampo de CA1

¿Qué efecto produce la morfina en la liberación de acetilcolina?

¿Qué efecto produce la morfina en la liberación de serotonina?

¿Qué efecto produce la morfina en la liberación de sustancia P?

¿Qué efecto produce la morfina en la liberación de GABA?

sináptico (Raggenbass y col, 1985). Existen receptores μ y δ en células no piramidales de la región CA1 del hipocampo que responden a los opioides con un incremento de la conductancia al K^+ . La hiperpolarización resultante reduce la liberación de GABA de la región, lo que causa un incremento en la excitabilidad de las células piramidales. La reducción de la inhibición de las células piramidales tiene varios efectos: la amplitud de los potenciales postsinápticos (PPS) excitatorios somáticos es mayor y la amplitud de los PPS inhibitorios dendríticos se reduce (Siggins y Zieglgänsberger, 1981; Dingleline, 1981; Henderson, 1983) y, aunque en CA3 se han visto efectos parecidos, también se ha observado que los péptidos opioides, en especial la dinorfina, pueden incrementar la excitabilidad (Chavkin, 1988).

Aunque en general, el efecto electrofisiológico de los opioides es la apertura de canales de K^+ (μ y δ) o el decremento de una corriente entrante de Ca^{++} (K), Crain y col (1988) han descrito un efecto excitatorio intrínseco de estos péptidos en neuronas de raíz dorsal en cultivo. Estos efectos excitatorios sólo se observan cuando se aplican concentraciones muy bajas (1 a 10 nM).

Para explicar los efectos electrofisiológicos de los opioides endógenos se han postulado varias vías o mecanismos subcelulares, que incluyen alteraciones del metabolismo de nucleótidos cíclicos (inhibición de la adenilato ciclasa e incremento de los niveles de GMP), los cambios en la fosforilación de proteínas, en la captura y en la función del calcio en las neuronas.

Al descubrir que los nucleótidos de guanina regulan el acople de los péptidos opioides a su receptor, se asociaron los receptores a opioides con la función tradicional de las proteínas G (o N, según la nomenclatura que se use). Estos estudios mostraron que los nucleótidos de guanina disminuyen el acople de los opioides con el receptor tanto en membranas de cerebro (Blume, 1978b; Childers y Snyder, 1979 y 1980), como en una línea celular (NG108-15) (Blume, 1978a) y que los receptores μ son menos sensibles a esta regulación que los δ .

En 1975, Sharma y col reportaron que los opioides inhiben la adenilato ciclasa. Posteriormente se describió que los opioides, además de inhibir la adenilato ciclasa, disminuyen la producción de AMPc y que la toxina

pertusis bloquea la acción de los opioides (Law y col, 1985; DeMontis y col, 1987). Este bloqueo pone de manifiesto que la inhibición se realiza por medio de una proteína G, misma que desempeña un papel importante en el acople receptores-canales (de calcio). Al agregar esta proteína a la preparación se revierte el efecto de la DADLE —un agonista opioide— sobre las corrientes de calcio (Hescheler y col, 1987). DeMontis y col (1987) mostraron que este mismo agonista y la dinorfina inhiben la actividad basal y estimulada de adenilato ciclasa en estriado de ratas y de cobayos y la naloxona antagoniza este efecto. Asimismo, Andrade y Aghajanian (1985) mostraron que tanto los opioides, como los agonistas $\alpha 2$ -adrenérgicos, activan la misma población de canales de K^+ en células de *locus coeruleus*. Este hallazgo sugirió que debe existir un sistema de segundos mensajeros común que acople o relacione a ambos tipos de receptores con estos canales. Estos autores describieron que análogos del AMPc revierten el efecto de los opioides y el pretratamiento de la preparación con pertusis bloquea las corrientes salientes de potasio inducidas tanto por agonistas opioides como por $\alpha 2$ -adrenérgicos (Aghajanian y Wang, 1986).

La disminución de la concentración intracelular de AMPc (Collier y Roy, 1974; Klee y col, 1976; Law y col, 1982), el incremento de GMPc en el cerebro (Gullis y col, 1975; Minneman e Iversen, 1976), la disminución de la captación de calcio en sinaptosomas (Guerrero Muñoz y col, 1979) y la inhibición de la calmodulina (Nehmed y col, 1982; Simantov y col, 1982) han sido postulados como responsables o, al menos, como componentes del fenómeno de abstinencia.

VI. OPIOIDES Y DEPENDENCIA

Una de las principales características de los narcóticos (agonistas opiáceos) es su capacidad para producir dependencia y tolerancia. La tolerancia implica que se necesitan dosis cada vez mayores para producir los mismos efectos iniciales. Para la mayoría de los opiáceos se presenta el fenómeno de tolerancia cruzada. Por otro lado, la dependencia física es, según la Organización Mundial de la Salud, "un estado que se caracteriza por la presentación de intensas perturbaciones físicas cuando se suspende la administración de la droga o se contrarresta su acción con un fármaco específico". Los cambios observados

durante la abstinencia son, en general, en dirección contraria a los observados durante la administración del agonista.

Para explicar la dependencia, las hipótesis de "contra-respuesta" postulan que durante la exposición crónica a los opiáceos se genera un mecanismo de respuesta a las acciones neurodepresoras. Estas hipótesis involucran cambios en el número y en la afinidad de los receptores. Sin embargo, varios autores han mostrado que no hay diferencias significativas en las concentraciones de receptores a opiáceos entre los tejidos de animales dependientes y los de animales sin exposición a morfina (Klee y Streaty, 1974; Höllt y col, 1975; Simon y col, 1975; Bonnet y col, 1976; Creese y Sibley, 1981) ni incremento en la afinidad del antagonista por sus sitios receptores (Klee y Streaty, 1974; Hitzeman y col, 1974; Simon y col, 1975).

Las teorías clásicas de ocupación establecen que la exposición prolongada a la morfina de un tejido no modifica la afinidad ni el número de receptores. Asimismo, estas teorías tipifican bien las acciones neurodepresoras de los agonistas opiáceos y su reversión por sus antagonistas, sin embargo, la precipitación de la abstinencia no se explica o no puede ser descrita con el modelo de ocupación.

Otra teoría que puede describir las respuestas no ocupacionales, es la teoría de velocidad que considera a la respuesta farmacológica no como el resultado de la ocupación de receptores, sino como el resultado del proceso de ocupación (Paton, 1961).

Algunas características de la respuesta de abstinencia como el decaimiento y el autoantagonismo se explican con los postulados de esta teoría, sin embargo, no explica el aumento de la sensibilidad de los antagonistas. A partir de las teorías de ocupación y de la teoría de velocidad, Villarreal y col (1985 y 1986) plantearon el modelo de las hipérbolas que considera que la respuesta farmacológica depende de la proporción de efectores activados a cada momento. Este modelo explica los cambios más importantes que se presentan en la dependencia a los opioides (Villarreal y col, 1986; Cruz, 1990). El fenómeno de la dependencia, sin embargo, es un problema biológico de gran magnitud en el que existen aún muchas incógnitas.

Por otro lado, la capacidad de los opioides para producir dependencia, hizo pensar que otro problema de dependencia, el alcoholismo, podía tener relación con el sistema endorfinérgico.

En este sentido, Jeffreys y col (1980) demostraron que el coma producido por la ingestión de etanol en el hombre es revertido por la administración de naloxona. Otros estudios muestran que el etanol disminuye la afinidad de las encefalinas por sus receptores (Hiller y col, 1981), en especial, el receptor δ (Tabakoff y Hoffman, 1983), debido principalmente a cambios conformacionales que el etanol produce sobre estos péptidos (Rapaka y col, 1986; Bhargava y Rapaka, 1987).

Asimismo, se ha comprobado que las concentraciones de endorfinas disminuyen tras la exposición crónica y aguda de etanol en roedores (Blumm y col, 1977; Seizinger y col, 1983) y aumentan en el coma alcohólico en el hombre (Jeffreys y col, 1980).

VII. OPIOIDES Y EPILEPSIA

El interés por conocer la relación entre estos péptidos y la epilepsia comenzó con los estudios de Urca y col, (1977) y de Henriksen y col (1978) que describieron que la aplicación intracerebroventricular (icv) de β -End o encefalinas producía crisis electrográficas en la rata.

Posteriormente, estudios con agonistas específicos para los distintos receptores a opioides (Snead y Bearden, 1982) determinaron que las propiedades "proconvulsivantes" de estos agonistas, inyectados icv, siguen el siguiente orden en potencia $\epsilon > \delta > \mu > \sigma > K$. Estos autores muestran que, salvo la morfina —agonista μ — que produce crisis convulsivas generalizadas, todos los agonistas utilizados producen crisis electrográficas tipo *petit mal*. El análisis electrográfico demostró que el foco primario se encontraba en el hipocampo y que se generalizaba a los hemisferios cerebrales. Estos resultados son consistentes con los datos que muestran un efecto inhibitorio de las encefalinas sobre las interneuronas inhibitorias gabaérgicas del hipocampo y explican sus efectos proconvulsivantes (Haas y Ryall, 1980).

La participación de los péptidos opioides en fenómenos epilépticos se ha demostrado con los modelos experimentales de epilepsia y de crisis convulsivas generalizadas. Es importante hacer esta distinción ya que la presentación de una crisis convulsiva no necesariamente implica una predisposición a tener otra, es decir, no es característica del estado epiléptico. Por otro lado, el estado de epiletización implica la presentación espontánea, súbita, autolimitada y repetida de fenómenos

electrográficos y conductuales paroxísticos o de crisis generalizadas.

El choque electroconvulsivo (Hong y col, 1979), las crisis producidas por la administración de pentilenetetrazol (Vindrola y col, 1983) y el "kindling"¹ o "encendimiento" amigdalino (Vindrola y col, 1981a y b) producen la liberación de péptidos opioides. Esto sugiere que los péptidos pueden participar en los fenómenos postictales, en los que se observa un estado de estupor similar a la catalepsia producida por agonistas opioides. Este razonamiento se apoya en las evidencias experimentales que muestran que la naloxona reduce la depresión postictal en el modelo de crisis electroconvulsiva (Tortella y col, 1981). Las crisis inducidas por este procedimiento inhiben la generación de crisis convulsivas subsecuentes (Tortella y col, 1985) o las provocadas por "kindling" amigdalino (Post y col, 1984; Shavit y col, 1984) y la aplicación repetida de naloxona produce crisis convulsivas generalizadas sin observarse depresión postictal (Pellicer y col, 1988).

Por otro lado, la participación de los péptidos opioides como anticonvulsivantes endógenos ha sido sugerida con base en estudios en los que la naloxona, al inhibir su acción, favorece la aparición e incrementa la duración de crisis convulsivas generalizadas (Corcoran y Wada, 1979; Hardy y col, 1980; Snyder y col, 1981).

En nuestro laboratorio hemos confirmado y ampliado estos datos al mostrar que la naloxona facilita el "kindling" amigdalino condensado (Fernández-Guardiola y col, 1986 y 1989) y que es capaz, por sí sola, de producir crisis convulsivas electrográficas en gatos en preparación "encéphale isolé" (Fernández-Guardiola y col, 1988). Asimismo, hemos mostrado que aplicada en dosis de 8 mg kg⁻¹ cada 15 minutos, es capaz de producir crisis convulsivas generalizadas en gatos íntegros en libre movimiento (Pellicer y col, 1988).

VIII. OPIOIDES Y PSIQUIATRÍA

Los péptidos opioides también han sido relacionados con patologías psiquiátricas, en especial, con la esquizofrenia y la depresión.

En 1976, Terenius y col encontraron niveles altos de β -End en el líquido cefalorraquídeo

de pacientes esquizofrénicos y posteriormente Terenius y col (1977) en pacientes deprimidos.

Bloom y col (1976) describieron que la aplicación intracisternal o intraventricular de β -End producía "un estado catatónico duradero... que se asemeja a algunos aspectos de la esquizofrenia... por lo que pudiera tener algún significado etiológico en la enfermedad mental". Más aún, que la administración de naloxona a un par de pacientes esquizofrénicos con alucinaciones auditivas produjo que éstas cesaran en unos minutos (Gunne y col, 1977), sin embargo, esto no pudo ser replicado en un estudio más minucioso (Volavka y col, 1977). En estos estudios, la dosis utilizada de naloxona fue de 0.4 mg, por lo que, según Watson y col (1978), los resultados no fueron consistentes. Estos autores, sin embargo, observaron una clara mejoría al utilizar una dosis de 10 mg en una población de 11 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia paranoide o indiferenciada en los que los efectos de la naloxona, la supresión de alucinaciones auditivas, fue efectiva y duradera (hasta 6 horas).

Ya que el tratamiento con neuropéptidos incrementa los niveles de encefalinas en el estriado y en el núcleo *acumbens* (Hong y col, 1978), se ha fortalecido la idea de que los opioides endógenos están involucrados en las psicosis y, en este sentido, hay numerosos trabajos que relacionan a los sistemas encefalinérgico y dopaminérgico (véase Hong y col, 1978, Emrich, 1984). Más aún, en un estudio *post-mortem* (Kleinman y col, 1983) se encontraron disminuidas las concentraciones de ME en el cuerpo caudado de esquizofrénicos paranoides y elevadas en adictos a opiáceos.

En este momento no es posible establecer una correlación inequívoca entre las variaciones en las concentraciones de encefalinas y los estados psicóticos ya que, a pesar de ocasionales reportes de terapias exitosas, existen resultados contradictorios.

CONCLUSIONES

La bibliografía sobre los opioides endógenos es abundante. La esperanza de encontrar un fármaco capaz de aliviar el dolor, entre otras virtudes, sin producir efectos indeseables ha hecho que grandes cantidades de recursos se hayan dirigido a la investigación básica y de desarrollo farmacéutico. Asimismo, el problema de la adicción ha generado investigaciones importantes.

¹ Estimulación subliminal iterativa.

La neurobiología de los opioides es en la actualidad, un campo muy activo de las neurociencias ya que estos péptidos intervienen en una cantidad de funciones que no se había sospechado.

Sus mecanismos de biosíntesis, de liberación y de catabolismo, sus acciones pre y postsinápticas, es decir, sus funciones como neurotransmisor y neuromodulador no son conocidas del todo. La multiplicidad de receptores y, por supuesto, de péptidos con propiedades "opioides" (más de 40) son un reto fascinante para el neurocientífico y... también causa dependencia.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a los doctores Augusto Fernández-Guardiola, Patricia Joseph, José Luis Díaz y Miguel Asai por sus comentarios y sugerencias. Este trabajo se realizó durante el ejercicio del donativo PO28CCOX-903739 del Conacyt al autor.

REFERENCIAS

- Aghajanian, GK, y YY, Wang, *Brain Res* (1986) 371, 390-394.
 Akil, H, SJ Watson, E Young, ME Lewis, H Khachaturian y JM Walker, *A Rev Neurosci* (1984) 7, 223-256.
 Andrade, R, y GK Aghajanian, *J Neurosci* (1985) 5, 2359-2364.
 Anis, NA, SC Berry, NR Burton y D Lodge, *Br J Pharmacol* (1983) 79, 565-575.
 Asai, M, A Cano, E Tlavera y M Zubieta, *Neuropeptides* (1988) 12, 41-42.
 Audigler, Y, H Mazarguil, R Gout y J Cros *Eur J Pharmacol* (1980) 63, 35-46.
 Bardo, MT, RK Bhatnagar y GF Gebhart, *Dev Brain Res* (1982) 4, 139-147.
 Barker, JL, TG Smith, Jr, y JH Neale, *Brain Res* (1978) 154, 153-158.
 Bayón, A, L Koda, E Battenberg, R Azad y FE Bloom, *Neurosci Lett* (1980) 16, 75-80.
 Becket, AH, y AF Casey, *J Pharmacol* (1954) 6, 986-1001.
 Berry, SC, SL Dawkins y D Lodge, *Br J Pharmacol* (1984) 83, 179-185.
 Bhargava, HN, y RS Rapaka, *Biochem Pharmacol* (1987) 37, 2279-2283.
 Bixby, JL, y NC Spitzer, *J Neurosci* (1983) 35, 1014-1018.
 Blanchard, SG, KJ Chang y P Cuatrecasas, *Life Sci* (1982) 32, 1311-1314.
 Blanchard, SG, KJ Chang y P Cuatrecasas, *J Biol Chem* (1983) 258, 1092-1097.
 Blomm, FE, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* (1983) 23, 151-170.
 Blomm, FE, D Segal, N Ling y R Guillemin, *Science* (1976) 194, 630-632.
 Blume, AJ, *Life Sci* (1978) 22, 1843-1852.
 Blume, AJ, *Proc Natl Acad Sci USA* (1978) 76, 1713-1717.
 Blumm, K, MG Hamilton y JE Wallace, "Alcohol and Opiates: A review of common neurochemical and behavioural mechanisms", *Alcohol and Opiates*. K Blumm (Ed) (Raven Press, Nueva York, 1977) pp 203-233.
 Bonnet, KA, JM Hiller y EJ Simon, *Proc Int Narcotic Res (Club Meet Aberdeen, Reino Unido, 1976)* pp 335-343.
 Bradley, PB, y A Dray, *Br J Pharmacol* (1974) 50, 47-55.
 Brauth, SE, *Neurosci* (1984) 11, 345-358.
 Brecha, N, HJ Karten y C Laverack, *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) 76, 3010-3014.
 Chang, KJ, RW Eckel y SG Blanchard, *Nature* (1982) 296, 446-448.
 Chang, KJ, BR Cooper, E Hazum y P Cuatrecasas, *Mol Pharmacol* (1979) 16, 91-104.
 Chavkin, C, "Electrophysiology of opiates and opioid peptides", *The Opiate Receptors*. GW Pasternak (Ed) (The Humana Press, 1988) pp 273-303.
 Chavkin, C, IF James y A Goldstein, *Science* (1982) 215, 413-415.
 Cherubini, E, RA North y T Tokimasa, *J Pharmacol Exp Ther* (1988) 247, 830-838.
 Childers, SR, y SH Snyder, *Life Sci* (1979) 23, 759-762.
 Childers, SR, y SH Snyder, *J Neurochem* (1980) 34, 583-593.
 Collier, HOJ, y AC Roy, *Nature* (1974) 248, 24-27.
 Cone, RI, y A Goldstein, *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) 79, 3345-3349.
 Corbett, AD, SJ Patterson, AT McKnight, J Magnan y HW Kosteritz, *Nature* (1982) 299, 79-81.
 Corcoran, ME, y JA Wada, *Life Sci* (1979) 24, 791-796.
 Cowan, A, JW Lewis y IR MacFarlane, *Br J Pharmacol* (1977) 60, 537-545.
 Crain, SM, K-F Shen y A Chalazonitis, *Brain Res* (1988) 455, 99-109.
 Creese, I, y DR Sibley, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* (1981) 21, 357-359.
 Cruz, SL, Tesis de Doctorado en farmacología (IPN, México, 1990).
 Del Castillo, J, y B Katz, *J Physiol* (1954) 124, 560-573.
 DeMottis, GM, P Devoto, A Preti y A Tagliamonte, *J Neurosci Res* (1987) 17, 435-439.
 Dingledine, R, *J Neurosci* (1981) 7, 1022-1035.
 Dingledine, R, RJ Valentino, E Bostock, ME King y KJ Chang, *Life Sci* (1983) 33 (Suppl 1), 333-336.
 Dorca, RM, y ME Rothenberg, *Peptides* (1987) 8.
 Duggan, AW, J Davis y JG Hall, *J Pharmacol Exp Ther* (1976) 196, 107-120.
 Duggan, AW, y RA North, *Pharm Rev* (1983) 35, 221-281.
 Echenoff, JE, y JD Elder, *Am J Med Sci* (1952) 223 191-197.
 Eldred, WD, y HJ Karten, *J Comp Neurol* (1985) 232, 36-42.
 Emrich, HM, *Psychiat Dev* (1984) 2, 97-114.
 Estivariz, FE, y FC Iturriza, *Peptides* (1985) 6, 817-824.
 Fernández-Guardiola, A, JM Calvo y F Pellicer, "Long-term synaptic potentiation and burst response increment could be due to enkephalinergic disinhibition. Experiments on the spinal cord and amygdaloid kindling", *Kindling 3*. JA Wada (Ed) (Raven Press, Nueva York, 1986) pp 157-172.
 Fernández-Guardiola, A, L Rocha, F Pellicer, R Gutiérrez y JM Calvo, *Epilepsy Res* (1989) 4, 55-62.
 Fernández-Guardiola, A, F Pellicer, L Rocha y R Gutiérrez, *R Exp Neurol* (1988) 101, 159-175.
 Gardner, EL, RS Zukin y MH Makman, *Brain Res* (1980) 194, 232-239.
 Gilbert, PE, y WR Martin, *J Pharmacol Exp Ther* (1976) 198, 66-82.
 Gintzler, AR, *J Pharmacol Exp Ther* (1979) 211, 7-12.
 Gintzler, AR, *Brain Res* (1980) 182, 224-228.
 Goldstein, A, LI Lowney y BK Pal, *Proc Natl Acad Sci USA* (1971) 68, 1742-1747.
 Graves, FB, PY Law, CA Hunt y HH Loh, *J Pharmacol Exp Ther* (1978) 206, 492-506.
 Guerrero-Muñoz, F, KV Cerreta, MI Guerrero y EL Way, *J Pharmacol Exp Ther* (1979) 209, 132-136.
 Guillemin, R, N Ling y R Burgus, *CR Acad Sci (Paris)* (1976) 282, 783-785.
 Guillis, R, J Traber y B Hamprecht, *Nature* (1975) 256, 57-59.

- Gunne, L-M, L Lindström y L Terenius, *J Neural Transm* (1977) 40, 13-19.
- Gutiérrez, R, *Comp Biochem Physiol* (1991) (En prensa).
- Gutiérrez, R, y M Asai, *Comp Biochem Physiol* (1991) 100 (3), 609-613.
- Hass, HL, y RL Ryall, *J Physiol (Londres)* (1980) 308, 315-330.
- Haertzen, CA, *Psychopharmacologia* (1970) 18, 306-367.
- Haertzen, Ca, "Subjective effects of narcotic antagonists", *Narcotic Antagonists*. MC Braude, LS Harris, EL May y JE Villarreal (Eds) (Raven, Nueva York, 1974) pp 383-398.
- Hardy, Ch, J Pankajcep, J Rossi III y J Zolovick, *Brain Res* (1980) 194, 3293-297.
- Henderson, G, *Br Med Bull* (1983) 39, 59-64.
- Henriksen, SJ, FE Bloom, F McCoy, N Ling y R Guillemin, *Proc Natl Acad Sci USA* (1978) 75, 5221-5225.
- Henschen, A, F Lottspeich, V Brantl, H Teschemacher y Z Hoppe-Seyler, *Physiol Chem* (1979) 360, 1217-1224.
- Hescheler, J, W Rosenthal, W Trautwein y G Schultz, *Nature* (1987) 325, 445-446.
- Hiller, JM, LM Angel y EJ Simon, *J Neurochem* (1981) 43, 1003-1010.
- Hirai, K, y Y Katayama, *Brain Res* (1988) 448, 299-307.
- Hitzeman, RJ, BA Hitzeman y HH Loh, *Life Sci* (1974) 14, 2393-2404.
- Hokfelt, T, O Johansson, A Ljungdahl, JM Lundberg y M Schultzberg, *Nature (Londres)* (1980) 284, 515-521.
- Hölt, V, J Dum, J Bläsig, P Schubert y A Hertz, *Life Sci* (1975) 16, 1823-1828.
- Holtzman, SG, "Narcotic antagonists as stimulants of behavior in the rat: specific and nonspecific effects", *Narcotic Antagonists*. MC Braude, LS Harris, EL May y JE Villarreal (Eds) (Raven, Nueva York, 1974) pp 371-382.
- Hong, JS, JC Gillin, HYT Yang y EJ Costa, *Brain Res* (1979) 177, 273-278.
- Hong, JS, HYT Yang, W Fratta y EJ Costa, *J Pharmacol Exp Ther* (1978) 205, 141-147.
- Houde, RW, *Br J Clin Pharmacol* (1979) 7, 297S-308S.
- Hughes, J, *Brain Res* (1975) 88, 295-306.
- Hughes, J, TW Smith, HW Kosterlitz, LA Fothergill, A Morgan y R Morris, *Nature* (1975) 258, 577-579.
- Jaros, PP, H Dirksen y R Keller, *Cell Tissue Res* (1985) 241, 111-117.
- Jeffreys, DB, RS Flanagan y GN Valans, *Lancet* (1980) 1, 308-309.
- Jessell, TM, y LL Iversen, *Nature (Londres)* (1977) 268, 549-551.
- Jia, M, y PG Nelson, *Peptides* (1987) 8, 565-568.
- Jia, M, y PG Nelson, *Peptides* (1987) 8, 559-563.
- Kawauchi, H, M Tsubokawa, A Kanezawa y H Kitagawa, *Biochem Biophys Res Commun* (1980) 92, 1278-1288.
- Kilpatrick, DL, RD Howells, H-W Lahm y S Udenfriend, *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) 80, 5772-5775.
- Klee, WA, A Lampert y M Nirenberg, "Dual regulation of adenylate cyclase by endogenous opiate peptides", *Opiates and Endogenous Opioid Peptides*. HW Kosterlitz (Ed) (Elsevier, Amsterdam, 1976) pp 153-159.
- Klee, WA, y RA Streaty, *Nature* (1974) 248, 61-63.
- Kleinman, JW, M Iadarola, S Govoni, J Hong, JC Gillin y RJ Wyatt, *Psychopharmacol Bull* (1983) 19, 375-377.
- Konishi, S, A Tsunoo y M Otsuka, *Nature* (1981) 294, 80-82.
- Kosterlitz, HW, JAH Lord, SJ Paterson y AA Waterfield, *Br J Pharmacol* (1980) 68, 333-342.
- Lacey, MG, y G Henderson, *Neurosci* (1986) 2, 485-494.
- Lahli, RA, RJ Collins, *Eur J Pharmacol* (1978) 51, 185.
- Lasagna, L, TJ Dekornfield y JW Pearson, *J Pharmacol Exp Ther* (1964) 144, 12-16.
- Law, PY, DS Hom y HH Loh, *Mol Pharmacol* (1983) 25, 413-424.
- Law, PY, JE Koehler y HH Loh, *Mol Pharmacol* (1982) 21, 483-491.
- Law, PY, AK Louie y HH Loh, *J Biol Chem* (1985) 260, 14818-14823.
- Leboulenger, F, A Cupo, E Castanas, M Benyamina, G Pelletier y H Vaudry, *Neurochem Int* (1986) 8, 303-309.
- León-Olea, M, M Sánchez-Álvarez, AL Piña y A Bayón, *J Comp Neurol* (1991) 305, 412-420.
- LeRoith, D, AS Liotta, J Roth, J Shiloach, ME Lewis, CB Pert y DT Krieger, *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) 79, 2086-2090.
- Leung, M, y GB Stefano, *Life Sci* (1983) 33 (Suppl 1), 77-80.
- Lindberg, I, y L White, *Arch Biochem Biophys* (1986) 245, 1-7.
- Lord, JAH, AA Waterfield, J Hughes y HW Kosterlitz, *Nature (Londres)* (1977) 267, 495-500.
- Macdonald, RL, y PG Nelson, *Science* (1978) 199, 1449-1451.
- Macdonald, RL, MA Werz, *J Physiol* (1986) 377, 237-249.
- Martens, GJM, y E Herbert, *Nature* (1984) 310, 251-254.
- Martin, WR, CG Eades, JM Thompson, RE Huppler y PJ Gilbert, *J Pharmacol Exp Ther* (1976) 197, 517-532.
- McCawley, WL, ER Hart y DF Marsh, *J Amer Chem Soc* (1941) 63, 314.
- Metcalf, G, JMH Rees y SJ Ward, *Br J Pharmacol* (1979) 66, 473-474.
- Minneman, KP, y LL Iversen, *Nature* (1976) 262, 313-314.
- Montecucchi, PC, R De Castiglione, S Piani, L Gozzini y V Erspamer, *Int J Peptide Protein Res* (1981) 17, 275-283.
- Mudge, AW, FE Leeman y GD Fishbach, *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) 76, 526-530.
- Nakata, Y, KJ Chang, CL Mitchell y JS Hong, *Brain Res* (1985) 346, 160-163.
- Nehmed, R, H Nadler y R Simantov, "Receptor and postreceptor alterations induced by opiates and solubilization of opiate receptors", *From Molecular Biology to Function*. E Costa y M Trabucchi (Eds) (Raven, Nueva York, 1982) pp 373-382.
- Neiswander, JL, JK Rowlett, AJ Nonneman y MT Bardo, "Up-regulation of opiate receptors following chronic naltrexone treatment in mature and aged male and female rats", *Biological and Synthetic Membranes* (Alan R Liss Inc, 1989) pp 471-476.
- North, RA, *TINS* (1986) marzo, 114-117.
- North, RA, y JT Williams, *J Physiol* (1985) 364, 265-280.
- Paton, WDM, *Proc Roy Soc B* (1961) 154, 21-69.
- Pellicer, F, L Rocha, R Gutiérrez, A Fernández-Guardiola, *Epilepsy* (1988) 29, 374-378.
- Pearl, J, H Stander y DB McKean, *J Pharmacol Exp Ther* (1969) 167, 9-13.
- Perrine, TD, L Atwell, IB Tice, AW Jacobson y EL May, *J Pharm Sci* (1972) 61, 86-88.
- Pert, CB, D Aposhian y SH Snyder, *Brain Res* (1974) 75, 356-361.
- Pert, CB, GW Pasternak, SH Snyder, *Science* (1973) 182, 1359-1361.
- Pert, CB, y SH Snyder, *Science* (1973) 31, 27-31.
- Pestarino, M, *Cell Mol Biol* (1985) 31, 27-31.
- Piccoli, R, D Melck, A Spagnuolo, S Vescia y L Zanetti, *Comp Biochem Physiol* (1985) 80, C 237-240.
- Pohl, JZ, *Exp Path Ther* (1915) 17, 370-378.
- Post, RM, F Putnam, NR Contel y B Goldman, *Epilepsia* (1984) 25, 234-239.
- Raggenbass, M, JP Warin, BH Gahwiler y JJ Dreifuss, *Brain Res* (1985) 344, 392-396.
- Rapaka, RS, R Venkatesan, TS Goehl y BJ Collins, *Life Sci* (1986) 39, 837-842.
- Reiner, A, BD Davis, NC Brechia y HJ Karten, *J Comp Neurol* (1984) 228, 245-262.
- Remy, CJ, *J Physiol (Paris)* (1982) 78, 514-522.
- Ronai, AZ, IP Berzetel, JI Szentkely, E Miglecz, J Kurgis y S Bajusz, *Eur J Pharmacol* (1981) 69, 263-271.
- Rossier, J, TM Vargo, S Minick, N Ling, FE Bloom y R Guillemin, *Proc Natl Acad Sci USA* (1977) 74 5162-5165.
- Rzasa, PJ, KV Kaloustian y EK Prokop, *Comp Biochem Physiol* (1984) 77C, 345-350.

- Satake, N, *Physiol Behav* (1979) 23, 995-999.
- Schultz, R, M Wuster y A Herz, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (1979) 306, 93-96.
- Seizinger, BR, K Bovermann, D Maysinger, V Höllt y A Hertz, *Pharmacol Biochem Behav* (1983) 18, 361-369.
- Sharma, SK, M Nirenberg y W Klee, *Proc Natl Acad Sci USA* (1975) 72, 590-594.
- Shavit, Y, S Caldecott-Hazard, J Liebeskind, *Brain Res* (1984) 305, 203-207.
- Shaw, JS, MJ Turnbull, AS Dutta, JJ Gromley, CF Hayward y GJ Stacey, "A structure-activity study with enkephalin analogues: further evidence for multiple opiate receptor types", *Characteristics and Function of Opioids*. JM Van Ree y L Terenius (Eds) (Elsevier, Nueva York, 1978) pp 185-195.
- Siggins, GR, W Zieglängsberger, *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) 78, 5235-5239.
- Simantov, R, D Baram y M Dornay, "Receptor and post-receptor alterations induced by opiates and solubilization of opiate receptors", *From Molecular Biology to Function*. E Costa y M Trabucchi (Eds) (Raven, Nueva York, 1982) pp 291-300.
- Simantov, R, SR Childers y SH Snyder, *Brain Res* (1977) 135, 358-367.
- Simantov, R, R Goodman, D Aposhian y SH Snyder, *Brain Res* (1976) 111, 204-211.
- Simon, EJ, JM Hiller e IJ Edelman, *Proc Natl Acad Sci USA* (1973) 70, 1947-1949.
- Simon, EJ, JM Hiller, J Groth e IJ Edelman, *J Pharmacol Exp Ther* (1975) 192, 531-537.
- Snead III, OC, y LJ Bearden, *Neuropharmacology* (1982) 21, 1137-1144.
- Snell, LD, y KM Johnson, *J Pharmacol Exp Ther* (1985) 235, 50-57.
- Snell, LD, y KM Johnson, *J Pharmacol Exp Ther* (1986) 238, 938-946.
- Snyder, EW, RW Dustman y CJ Schlehuber, *J Pharmacol Exp Ther* (1981) 217, 299-305.
- Tabakoff, B, y PL Hoffman, *Life Sci* (1983) 32, 197-204.
- Teal, JJ, y SG Holtzman, *J Pharmacol Exp Ther* (1980) 212, 368-376.
- Tempel, A, EL Gardner y RS Zukin, *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) 81, 3893-3897.
- Tepper, P, y JH Woods, *Psychopharmacology* (1978) 58, 125-129.
- Terenius, L, *Acta Pharmacol Toxicol (Copenhagen)* (1973) 32, 317-320.
- Terenius, L, y A Wahlström, *Acta Physiol Scand* (1975) 94, 81.
- Terenius, L, A Wahlström y H Agren, *Psychopharmacology* (1977) 54, 31-33.
- Terenius, L, A Wahlström, L Lindström y E Widerlov, *Neurosci Lett* (1976) 3, 157-162.
- Thompson, AM, y D Lodge, *Neurosci Lett* (1985) 54, 21-26.
- Thompson, AM, DC West, y D Lodge, *Nature (Londres)* (1985) 313, 479-481.
- Tortella, FC, A Cowan, GL Belenky y JW Holaday, *Eur Pharmacol* (1981) 76, 121-128.
- Tortella, FC, JB Long y JW Holaday, *Brain Res* (1985) 332, 174-178.
- Tremblay, JP, WT Schlapfer, PBJ Woodson y SH Barondes, *Brain Res* (1974) 81, 107-118.
- Turner, AJ, *Essays in Biochemistry* (1986) 22, 69-119.
- Turner, AJ, *Trends Neurosci* (1984) 7, 258-260.
- Ueda, H, N Fukushima, Y Yoshihara y H Takagi, *Brain Res* (1987) 419, 197-200.
- Udenfriend, S, y DL Kilpatrick, *Arch Biochem Biophys* (1983) 221, 309-323.
- Unna, K, *J Pharmacol Exp Ther* (1943) 79, 27-31.
- Urca, G, H Frenk, JC Liebeskind y AN Taylor, *Science* (1997) 197, 83-86.
- Vaudry, H, BG Jenka y AP van Overbeke, *Peptides* (1984) 5, 905-912.
- Vaupel, B, *Eur J Pharmacol* (1983) 92, 269-274.
- Vaupel, DB, ME Risner y HE Shannon, *Drug Alcohol Depend* (1986) 18, 173-194.
- Venturini, G, A Carolei, G Palladini, V Margotta y MG Lauro, *Camp Biochem Physiol* (1983) 74C, 23-25.
- Villarréal, JE, LA Salazar, JE Herrera y S Cruz *NIDA Research Monographs* (1985) 67, 105-111.
- Villarréal, JE, LA Salazar, JE Herrera y S Cruz, *NIDA Research Monographs* (1986) 76, 281-287.
- Vindrola, O, M Asai, M Zubieta y G Linares, *Eur J Pharmacol* (1983) 90, 85-89.
- Vindrola, O, R Briones, M Asai y A Fernández-Guardiola, *Neurosci Lett* (1981a) 21, 39-43.
- Vindrola, O, R Briones, M Asai, A Fernández-Guardiola, *Neurosci Lett* (1981b) 26, 125-130.
- Volavka, J, A Mallya, S Baig y J Pérez-Cruet, *Science* (1977) 196, 1227-1228.
- Watson, SJ, PA Berger, H Akil, MJ Mills y JD Barchas, *Science* (1978) 201, 73-76.
- Waziri, R, *Camp Biochem Physiol* (1976) 55C, 95-102.
- Weijlard, J, y AE Erickson, *J Amer Chem Soc* (1942) 64, 869-890.
- Werz, MA, y RL Macdonald, *Neurosci Lett* (1983) 42, 173-178.
- White, JD, KD Stewart, JE Krause y JF McKelvy, *Physiol Rev* (1985) 65, 553-606.
- Wolters, JG, HJ ten Donkelaar y AA Verhofstad, *J Neurosci* (1986) 18, 917-946.
- Wood, PL, *Neuropharmacology* (1982) 21, 487-497.
- Woods, JH, CL Fly y HH Swain, *Develop Neurosci* (1978) 4, 403-411.
- Yaksh, TL, *Pain* (1981) 11, 293-346.
- Zagon, IS, SR Goodman y PJ McLaughlin, *Brain Res* (1989) 482, 297-305.
- Zieglängsberger W, e IF Tulloch, *Brain Res* (1979) 167, 33-64.
- Zukin, RS, JR Sugarman, ML Fitz-Syage, EL Gardner, SR Zukin y AR Gintzler, *Brain Res* (1982) 245, 285-292.
- Zukin, RS, SR Zukin, *Mol Pharmacol* (1981) 20, 246-254.

ABSTRACT

The discovery of the endogenous morphine(s) or endorphins during the 1970s led to the production of a great amount of work and soon everybody ascribed to these peptides all kinds of properties. Moreover, more than 40 peptides with morphine-like effects have been described. The interest for having an agent capable of mimicking some desirable effects of morphine (sedation, analgesia, avoiding withdrawal syndrome, producing psychotropic effects) without having side effects (eliciting constriction, hypothermia, tolerance, dependence) has fostered many researchers, basic and clinic, as well as pharmaceutical companies, to address this fascinating field of the neurobiology of opioids. This article summarizes some general aspects of the current topics in which these peptides play a protagonic role.

CAPITULO II

**IR-MET AND IR-LEU-ENKEPHALIN CONTENT IN THE
PERIOESOPHAGEAL GANGLIA OF HELIX ASPERSA. SEASONAL
VARIATIONS**

IR-MET AND IR-LEU-ENKEPHALIN CONTENT IN THE PERIOESOPHAGEAL GANGLIA OF *HELIX ASPERSA* SEASONAL VARIATIONS

R. GUTIÉRREZ* and M. ASAI

División de Neurociencias Instituto Mexicano de Psiquiatría, México

(Received 18 January 1991)

Abstract—1. In order to determine the presence of opioid peptides and their possible variation throughout the year in the different ganglia of the perioesophageal ring of the terrestrial snail *Helix aspersa*, radioimmunoassays with highly specific antisera risen for Met-enkephalin (ME) and Leu-enkephalin (LE) were carried out monthly.

2. Clear monthly variations in both IR-enkephalins' concentrations were found, following a seasonal trend. IR-LE concentrations were higher than IR-ME throughout the year in all the regions, however, no clear regional differences were found for each.

3. IR-LE/IR-ME ratios presented defined seasonal peaks for each region.

INTRODUCTION

A number of behavioral studies have demonstrated clear naloxone-reversible opiate-like functions in molluscs. Moreover, the mollusc opiate system has been thought to be involved in locomotion (Burrowes *et al.*, 1983), behavioral thermoregulation (Kavaliers and Hirst, 1984), feeding behavior (Kavaliers and Hirst, 1987) and nociception (Kavaliers, 1988; Dalton and Widdowson, 1989). Other behavioral studies have shown the development of tolerance to opiates in *Helix pomatia* (Stefano *et al.*, 1981).

The interaction of the endogenous opioid system with other neurotransmitter systems has also been reported in molluscs. Enkephalin-like neuropeptides regulate the release of transmitter from dopaminergic nerves (Stefano *et al.*, 1981), modulate the central dopaminergic control of ciliary activity in *Mytilus edulis* (Aiello *et al.*, 1986), and increase the dopamine and HVA content in a naloxone-reversible manner in *Helix pomatia* (Osborne and Neuhoff, 1979). Electrophysiological evidences also support the interaction of opioids with dopaminergic (Stefano *et al.*, 1979) and cholinergic systems (Tremblay *et al.*, 1974; Waziri, 1976).

Stefano and Leung (1984) and Leung *et al.* (1986) have determined the presence of Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ as well as Met-enkephalin (ME) and Leu-enkephalin (LE) in molluscan neural tissues by HPLC and radioimmunoassay techniques. Schot *et al.* (1981), in an immunocytochemistry study on the snail *Lymnaea stagnalis*, have reported reactive neurons to various peptides of vertebrates, including ME.

Although all these evidences strongly support the idea of a physiologically functional opioid system in

the CNS of molluscs, a number of electrophysiological studies (Ku *et al.*, 1986; Yongsiri *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1987) have reported either a lack of responses of mollusc neurons to opiates or a variety of inconsistent effects, questioning the existence of receptors to opioid peptides. We have observed consistent effects of agonists and antagonists of opioid peptides on the membrane potential of identified neurons of *Helix aspersa* (Gutiérrez, 1988, 1989).

No opioid peptides have been directly determined in *Helix aspersa*, and since a possible cause for the different electrophysiological responses that have been observed in molluscs could be intrinsic seasonal changes in the opiate system as has been demonstrated (Stefano *et al.*, 1981; Stefano and Leung, 1986; Bianchi and Wang, 1986), we decided to determine the presence, the regional distribution and the possible variation of ME and LE throughout the year in the perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*.

METHODS

Snails were collected from Tlaxcala, México, and maintained in an acrylic box in the laboratory at least two months before they were used. They were hydrated and fed once a week with lettuce or bread and were kept in a light-dark cycle of 12:12 hr at 21°C. A week before the experiment, they were daily hydrated.

The experiments were carried out once a month by day 15 (± 5 days) between 11 a.m. and 1 p.m. Twenty snails, each weighing 3.0 ± 0.25 g were used for each experiment. The perioesophageal ganglia were dissected and pinned to a Petri dish in Ringer solution (in mM: NaCl, 75; KCl, 2.5; CaCl₂, 10; MgCl₂, 5; Hepes, 5; pH 7.45), where the connective tissue was removed under microscopical observation. The last sheath of tissue was left intact to avoid segregation of the neurons.

After the connective tissue was removed, the ganglia were divided into three portions. One portion corresponded, according to the nomenclature of Kerkut *et al.* (1975) to ganglia A and B (left and right cerebral), hereunder called cerebral ganglia. These ganglia also contained the caudo-dorsal cells. A second one to ganglia C (left pleural), D (left

*Address correspondence to: R. Gutiérrez, División de Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calzada México-Xochimilco 101, Col. Sn Lorenzo Huipulco, México, D.F. 14370. Fax: (905) 655-0411.

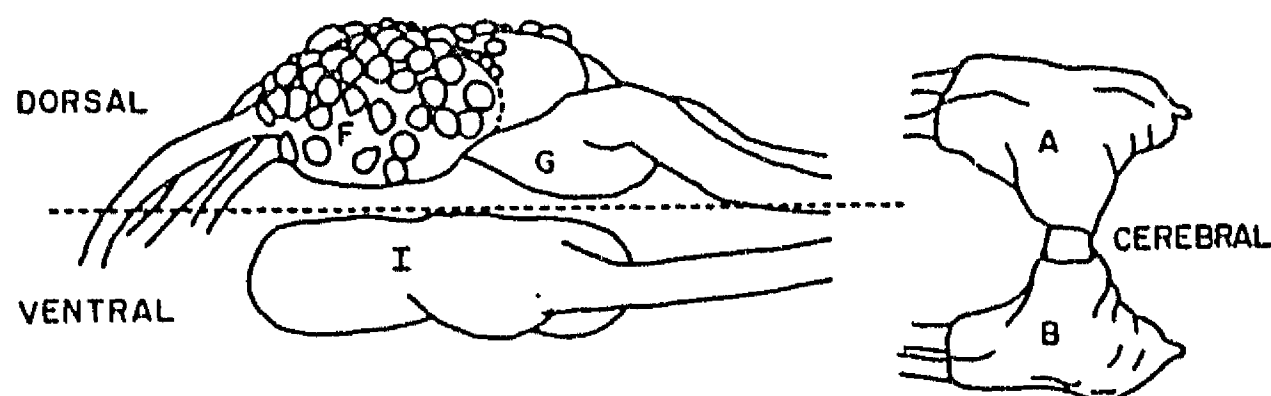


Fig. 1. Regions into which the periesophageal ring was divided (modified from Kerkut *et al.*, 1975).

parietal), E (visceral), F (right parietal), and G (right pleural), hereunder called dorsal ganglia. A third part, hereunder called ventral ganglia, contained ganglia H (left pedal) and I (right pedal) (Fig. 1).

The cerebral, dorsal and ventral ganglia were then pooled and weighted. Each pool was incubated in 6 vol of 0.1 N HCl at 95° for 15 min, cooled in ice bath, homogenized and 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. Methionine and leucine enkephalins were assayed in triplicate by radioimmunoassay with antisera risen previously in our laboratory (Vindrola *et al.*, 1981).

The LE antiserum displayed a cross reactivity of 5.9% with ME and 1.4% with dynorphin 1-13. Cross-reactivities were negligible with α , γ and β -endorphins. The ME antiserum showed a 100% cross reactivity with Met(o)-enkephalin, 0.3% with LE, 0.2% with the heptapeptide ME-arg⁶-phe⁷, and less than 0.01% with ME-arg⁶, dynorphin 1-13, dynorphin 1-8, the octapeptide ME-arg⁶-gly⁷-leu⁸, α , γ and β -endorphins. The dilution curves of tissue extracts were parallel to those obtained with authentic enkephalins. Tissue content of each enkephalin is expressed as pmol of immunoreactivity (IR-enkephalin/g wet weight).

RESULTS

The total amount and the regional distribution of IR-ME and IR-LE concentrations throughout the year are shown in Table 1. The total amount of IR-enkephalins (T-LE, T-ME) in the periesophageal ganglia has a clear and almost parallel variation throughout the year (Fig. 2). The monthly concentration of IR-LE is higher than that of IR-ME except in January and February. The ratio T-LE/T-ME shows seasonal peaks, though the regional variations in the IR-LE/IR-ME ratios follow different trends.

The monthly distribution of both peptides in the separate ganglia is depicted in Figs 3, 4 and 5. Both peptides are evenly distributed among the three struc-

tures and there were no significant differences in the concentrations as revealed by the Friedman rank analysis. On the other hand, the temporal variation of each peptide occurs in a similar trend in all the structures. Kendall coefficients of concordance for VG, DG and CG are $W = 0.728$ ($P < 0.01$; 11 DF) for IR-LE, $W = 0.803$ ($P < 0.005$; 11 DF) for IR-ME and $W = 0.584$ ($P < 0.3$; 11 DF) for IR-LE and IR-ME totals.

IR-LE concentration is higher than IR-ME in all the three regions. In the DG, the IR-LE/IR-ME ratios are constant except for a peak during spring. CG shows two peaks in spring and autumn and VG has 4 peaks, apparently following a seasonal variation (see Figs 3, 4 and 5).

DISCUSSION

These results strongly suggest the existence of opioid peptides in the land snail *Helix aspersa* and determine the concentrations of both IR-ME and IR-LE in the periesophageal ganglia throughout the year. Two important aspects are to be considered. One is that the concentration of IR-LE surpasses that of IR-ME. The second is that both peptides' concentrations tend to follow a seasonal variation. It is assumed that this variation does not depend on the weather conditions (see Methods), and this suggests that an internal biological clock controlling opioid peptides' synthesis might be present. Spring and autumn are the seasons when the snail reproduce in their natural environment. Although the growing and reproducing periods are determined or limited by the environmental humidity, the physiological changes that precede these events continue all year long (Gomot and Deray, 1987). Thus, it is noteworthy that the peaks of IR-LE/IR-ME ratios occur during

Table 1. Monthly concentrations of Met-enkephalin and Leu-enkephalin in the ventral, dorsal and cerebral ganglia of *Helix aspersa* (in pmol/g wet tissue)

	ME				LE				Ratio LE/ME			
	VG	DG	CG	Total	VG	DG	CG	Total	VG	DG	CG	Total
Jan	174.07	127.80	62.80	364.67	151.80	47.75	59.45	259.00	0.87	0.37	0.95	0.71
Feb	116.35	46.96	55.01	218.32	30.02	36.83	61.00	127.85	0.26	0.78	1.11	0.59
Mar	4.24	3.38	3.61	11.23	104.12	121.13	97.54	322.79	24.56	35.84	27.02	28.74
Apr	17.40	2.38	1.46	21.24	425.00	63.68	113.65	602.33	24.43	26.76	77.84	28.36
May	2.23	73.23	10.87	186.33	181.64	410.21	253.51	845.36	1.78	5.60	23.32	4.54
Jun	0.28	16.78	25.03	42.09	170.86	103.64	154.93	429.43	510.21	6.18	6.19	10.20
Jul	41.48	61.73	63.49	166.70	363.47	332.75	229.20	925.42	8.76	5.39	3.61	5.55
Aug	181.25	44.40	79.56	305.21	396.66	428.00	411.67	1236.33	2.19	9.64	5.17	4.05
Sep	2.87	12.28	2.54	17.69	124.60	76.02	120.68	321.30	43.42	6.19	47.51	18.16
Oct	20.86	29.16	28.10	78.12	314.56	182.59	92.08	589.23	15.08	6.26	3.28	7.54
Nov	65.11	17.20	42.53	124.84	165.89	110.06	297.10	573.05	2.55	6.40	6.97	4.59
Dec	1.38	5.01	15.17	21.56	72.31	26.46	106.44	205.21	52.40	5.28	7.02	9.52

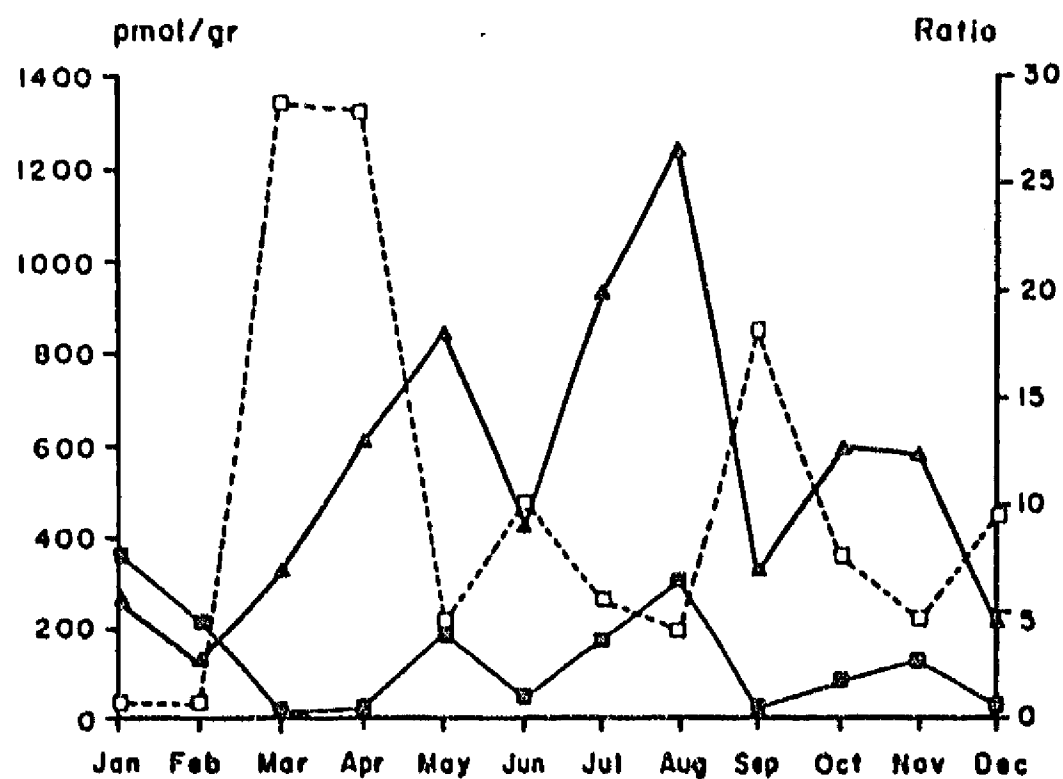


Fig. 2. Seasonal variation of the concentrations of IR-ME (■), IR-LE (▲), and the ratio IR-LE/IR-ME (□) in the complete perioesophageal ring.

spring and autumn in the lack of environmental changes.

A seasonal pattern of variation was also found in opioid binding studies on the bivalve *Mytilus edulis* (Stefano and Leung, 1986). These authors found that at the end of the summer, stereospecific binding increase with time and maximal binding of D-Ala²-Met⁵-enkephalinamide occurs in spring (May) and autumn (October) whilst the affinity of the receptor for DAMA does not change. They conclude that this seasonal dependence of enkephalin binding provides a possible explanation for the inability of a number of studies to detect stereospecific binding of opiates in invertebrates. Our results show that IR-LE concentrations rise during spring and summer, though a peak is observed during autumn. On the other hand, IR-ME follows a somewhat different trend,

specially in CG where the lower values occur during spring and the higher during summer. The analysis of IR-LE/IR-ME ratios show that its trend coincide with the double peak trend seen in the above mentioned binding studies. In agreement with Stefano and Leung (1986), we suggest that the reports on the lack of effects of opiate peptides on neuronal activity (Ku *et al.*, 1986; Yongsiri *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1987) may be due to the season in which the experiments are carried out.

The regional distribution of both peptides has a high concordance coefficient, though the existence of a triggering structure or phase shifts among the three regions cannot be discarded since the sampling rate, one month, may be obscuring a possible underlying command event occurring at a different time scale.

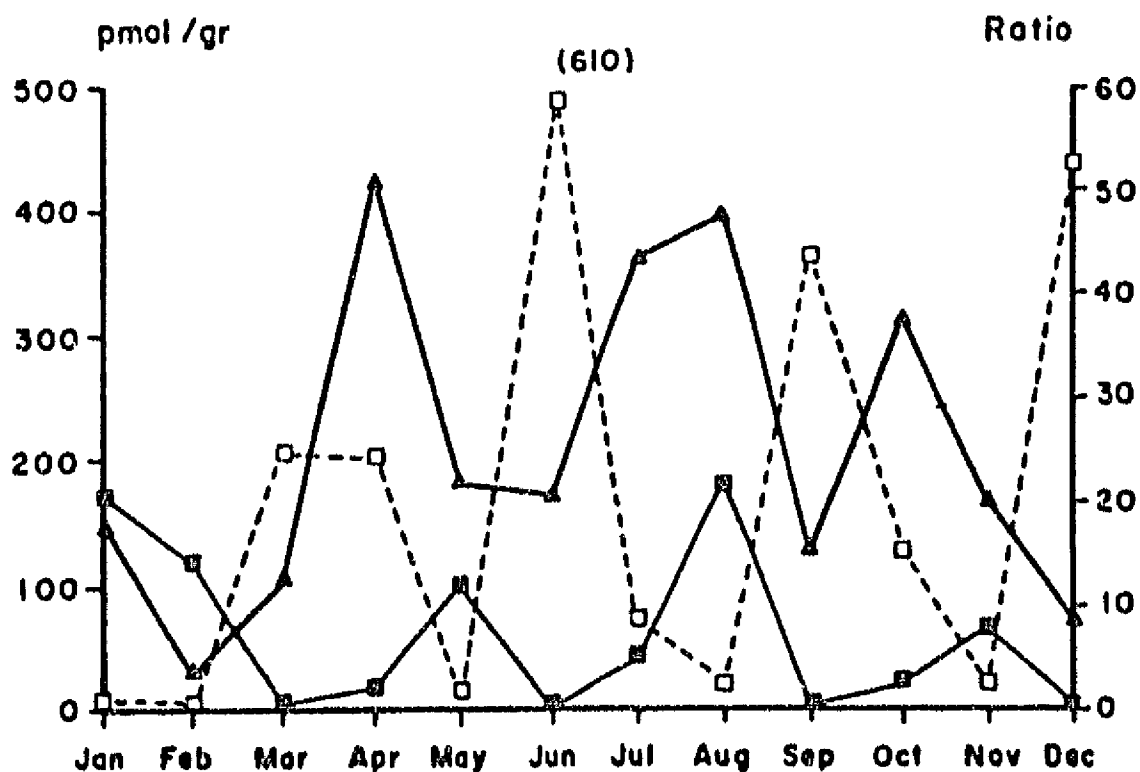


Fig. 3. Seasonal variation of the concentrations of IR-ME (■), IR-LE (▲), and the ratio IR-LE/IR-ME (□) in the ventral ganglia.

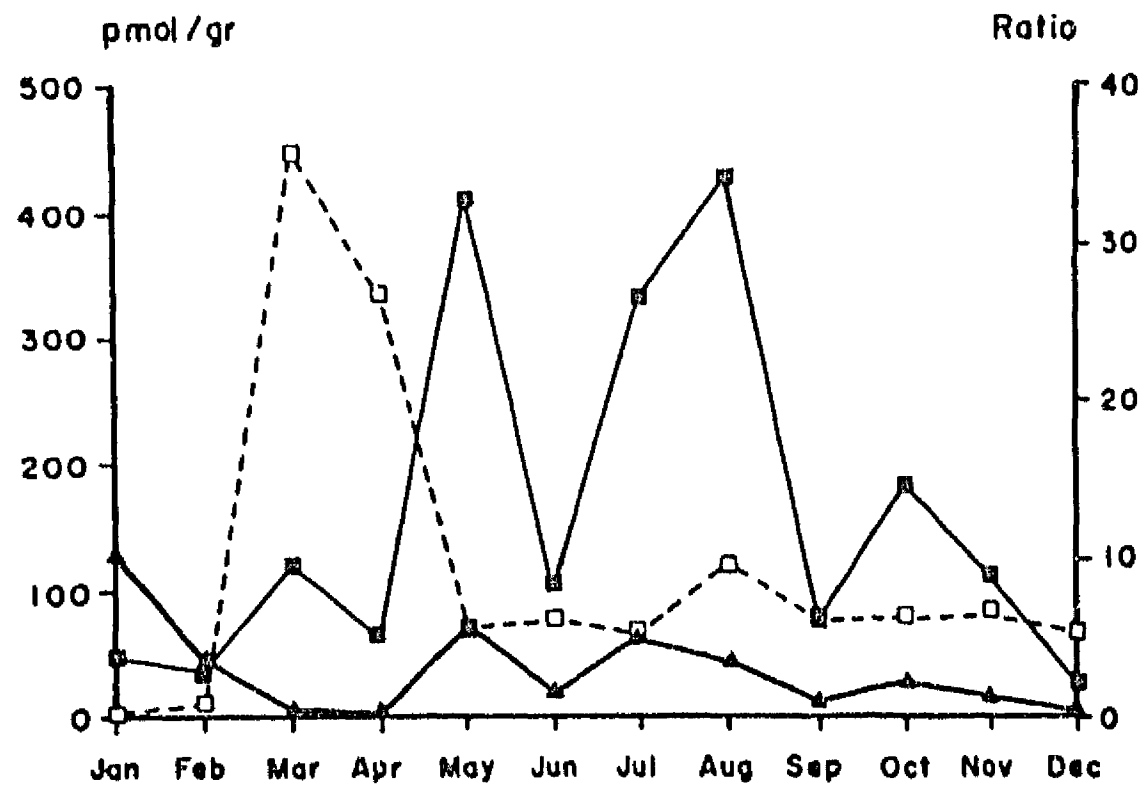


Fig. 4. Seasonal variation of the concentrations of IR-ME (■), IR-LE (▲), and the ratio IR-LE/IR-ME (□) in the dorsal ganglia.

That IR-LE concentration is higher than that of IR-ME can be explained by a higher release of ME or by an enhanced biosynthesis of LE. A third possibility comprises both events.

The pre-protein coding for both enkephalins in mammals is Proenkephalin A that contains four sequences of ME, 1 sequence of LE, 1 of ME-arg⁶-gly⁷ and 1 of ME-arg⁶-gly⁷-leu⁸ (Noda *et al.*, 1982; Comb *et al.*, 1982). On the other hand, all the dynorphins, whose precursor is Prodynorphin or Proenkephalin B, contain, at least, one copy of LE (Kakidani *et al.*, 1982).

The fact that mammalian Proenkephalin A contains 1 sequence of LE and that Prodynorphin contains three copies of LE sequence may indicate that mollusc LE can be derived from both precursors. Nevertheless, an intriguing fact discovered by Martens and Hebert (1984) poses a ques-

tion on this issue. These authors demonstrated that *Xenopus laevis* Proenkephalin A does not contain the sequence of LE. If an evolutionary continuum is assumed, it can be thought then that LE can be exclusively derived from Proenkephalin B in *Helix aspersa*.

Although it has been repeatedly demonstrated that opiate peptides systems are very similar in invertebrate and mammals, a thorough study of the different precursors and intermediate products of the opiate peptides families is still lacking.

Acknowledgements—This work was partially supported by grant P028CCOX-903739 from CONACyT and grant 3220 from I.M.P. to R.G. and P028CCOX-903600 to M.A. The authors thank Mr Armando Solórzano for technical assistance, Mr Raul Cardoso for the illustrations and doctors

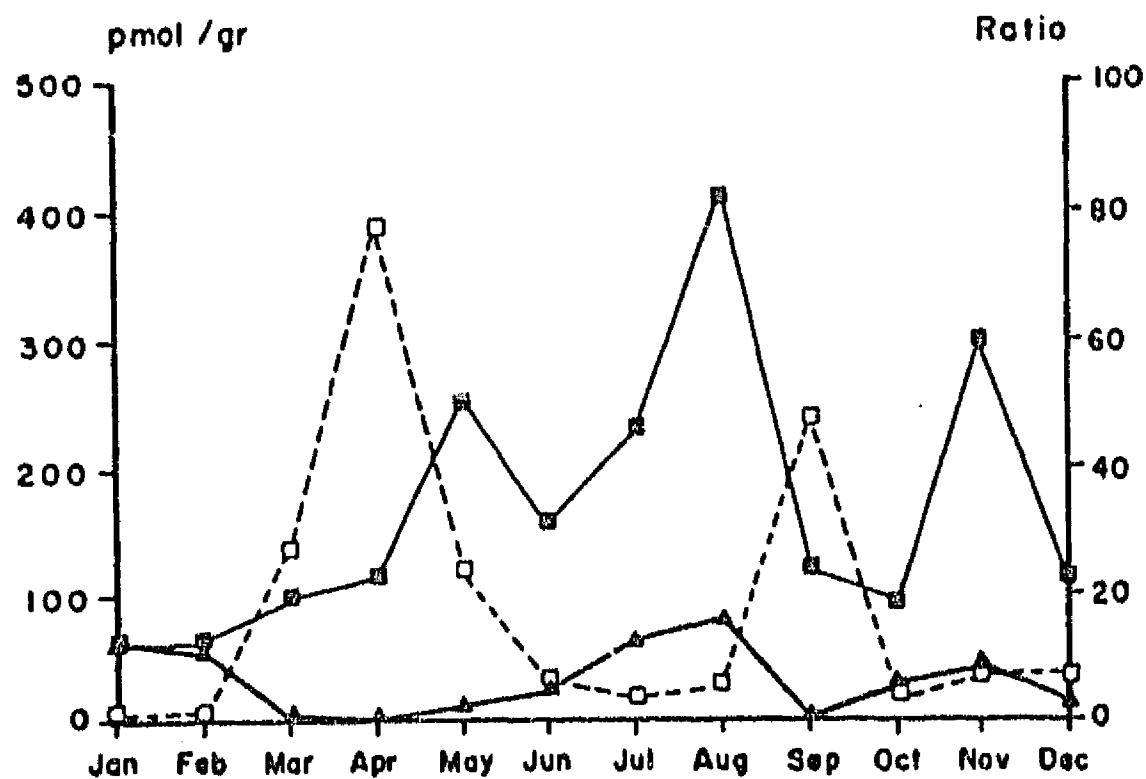


Fig. 5. Seasonal variation of the concentrations of IR-ME (■), IR-LE (▲), and the ratio IR-LE/IR-ME (□) in the cerebral ganglia.

H. Aréchiga, J. L. Diaz and A. Fernández-Guardiola for critical review of the manuscript.

REFERENCES

- Aiello E., Hager E., Akiwumi C. and Stefano G. B. (1986) An opioid mechanism modulates central and not peripheral dopaminergic control of ciliary activity in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Cell. Mol. Neurobiol.* 6, 17-30.
- Bianchi C. P. and Wang Z. (1986) Morphine enhancement of the cholinergic response of anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. In *Handbook of Comparative Opioid and Related Neuropeptide Mechanisms Vol. II* (Edited by G. B. Stefano), pp. 59-64. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Burrowes W. R., Assanah P. and Stefano G. B. (1983) Behavioral effects of opiates on the land snail *Helix aspersa*. *Life Sci.* 33 (Suppl. 1), 381-384.
- Comb M., Seeburg P. H., Adelman J., Eiden L. and Hebert E. (1982) Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* 295, 663-666.
- Dalton L. M. and Widdowson P. S. (1989) The involvement of opioid peptides in stress-induced analgesia in the slug *Arion ater*. *Peptides* 10, 9-13.
- Gomot L. and Deray A. (1987) Los caracoles. *La Recherche* (Sp. Tr.) 7, 478-489.
- Gutiérrez R. (1988) Naloxone effects on identified enkephalinergic and non-enkephalinergic neurons of *Helix aspersa*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14, 403.
- Gutiérrez R. (1989) Efecto de la naloxona sobre neuronas identificadas de caracol *Helix aspersa*. *Rev. Mex. Psic.* 6, 91-92.
- Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H., Noda M., Morimoto Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Nakanishi S. and Numa S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neoendorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298, 245-249.
- Kavaliers M. (1988) Novelty-induced opioid analgesia in the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. *Physiol. Behav.* 42, 29-32.
- Kavaliers M. and Hirst M. (1984) The presence of an opioid system mediating behavioral thermoregulation in the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. *Neuropharmacology* 23, 1285-1289.
- Kavaliers M. and Hirst M. (1987) Slugs and snails and opiate tales: opioids and feeding behavior in invertebrates. *Federation Proc.* 46, 168-172.
- Kerkut G. A., Lambert J. D. C., Galyton R. J., Loker J. E. and Walker R. (1975) Mapping of nerve cells in the suboesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 50A, 1-25.
- Kim K. H., Yongsiri A., Takeuchi H., Yanaihara N., Munekata E. and Ariyoshi Y. (1987) Effect of synthetic peptides on giant neurons identified in the ganglia of an African giant snail (*Achatina fulica Ferussac*)—III. *Comp. Biochem. Physiol.* 87C, 59-61.
- Ku B. S., Takeuchi H., Yanaihara N., Munekata E. and Ariyoshi Y. (1986) Effects of synthetic peptides on giant neurons identified in the ganglia of an African giant snail (*Achatina fulica Ferussac*). *Comp. Biochem. Physiol.* 84C, 391-396.
- Leung M. K., Mixon B., Kuruvilla S., Boer H. H. and Stefano G. B. (1986) Biochemical evidence for opioids in ganglia of the snail *Lymnaea stagnalis*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 12, 408.
- Martens G. and Hebert E. (1984) Polymorphism and absence of leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. *Nature* 310, 251-254.
- Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S. and Numa S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295, 202-206.
- Osborne N. N. and Neuhoff V. (1979). Are there opiate receptors in the invertebrates. *J. Pharm. Pharmacol.* 31, 481.
- Schot L. P. C., Boer H. H., Swaab D. F. and Van Noorden S. (1986) Immunocytochemical demonstration of peptidergic neurons in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* with antisera raised to biologically active peptides of vertebrates. *Cell Tiss. Res.* 216, 273-291.
- Stefano G. B., Hall B., Makman M. H. and Dvorkin B. (1981) Opioid inhibition of dopamine release from nervous tissue of *Mytilus edulis* and *octopus bimaculatus*. *Science* 213, 928-930.
- Stefano G. B., Hiripi L., S.-Rozsa K. and Salanki J. (1981) Behavioural effects of morphine on the land snail *Helix pomatia*. Demonstration of tolerance. In *Advances in Physiology and Scientific Neurobiology of Invertebrates* (Edited by Salanki J.), pp. 285-294. Pergamon Press, Oxford.
- Stefano G. B., Kream R. M., Zukin R. S. and Catapano E. J. (1981) Seasonal variation of stereospecific enkephalin binding and pharmacological activity in marine molluscs nervous tissue. In *Advances in Physiology and Scientific Neurotransmitters in Invertebrates* (Edited by S.-Rozsa K.), pp. 453-458. Pergamon Press, London.
- Stefano G. B. and Leung M. K. (1984) Presence of met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ in molluscan neural tissues. *Brain Res.* 298, 362-365.
- Stefano G. B. and Leung M. K. (1986) Opioid aging and seasonal variations in invertebrate ganglia: evidence for an opioid compensatory mechanism. In *Handbook of Comparative Opioid and Related Neuropeptide Mechanisms vol. II* (Edited by Stefano G. B.), pp. 199-210. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Stefano G. B., Vadasz I. and Hiripi L. (1979) Naloxone selectively blocks dopamine response of Br-type neuron in *Helix pomatia* L. *Experientia* 35, 1337-1338.
- Tremblay J. P., Schlapfer W. T., Woodson P. B. J. and Barondes S. H. (1974) Morphine and related compounds evidence that they decrease available neurotransmitter in *Aplysia californica*. *Brain Res.* 81, 107-118.
- Vindrola O., Briones R., Asai M. and Fernández-Guardiola A. (1981) Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in rat brain. *Neurosci. Lett.* 21, 39-43.
- Waziri R. (1976) Morphine effects on cholinergic synaptic transmission in *Aplysia* evidence for receptor blockade. *Comp. Biochem. Physiol.* 55C, 95-102.
- Yongsiri A., Kim K. H., Takeuchi H., Yanaihara N., Munekata E. and Ariyoshi Y. (1987) Effect of synthetic peptides on giant neurons identified in the ganglia of an African giant snail (*Achatina fulica Ferussac*)—II. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C, 353-356.

CAPITULO III

**SYNAPTIC INTERACTIONS BETWEEN IDENTIFIED NEURONS
OF *HELIX ASPERSA*. I. HOMOSYNAPTIC DEPRESSION**

SUMMARY

Key words: *Helix*; Homosynaptic depression; Habituation; Identified synapse; Quantal analysis; Synaptic transmission.

It is well established that the cellular mechanism that underlies habituation, homosynaptic depression, consists in the reduction of neurotransmitter release, as has been demonstrated in *Aplysia*. *Helix aspersa* is another mollusc broadly used for pharmacological experiments. Synaptic interactions in this mollusc are poorly documented. Thus, the present experiments show the identification and characterization of a chemical synapse as well as the quantal parameters and habituation kinetics. This seemed important specially considering that this snail posses a functional opioid system that can be involved in synaptic modulation. The habituation characteristics and reduction trend of quantal content were determined and the latter was found to be higher than that previously reported in *Aplysia*. Also, it was found that mobilization of neurotransmitter is either faster than the one seen in *Aplysia* and in immature spinal cord, or that the activity-dependent mobilization mechanism in *Helix* is more effective.

INTRODUCTION

Habituation has been for so long widely studied along the phylogeny in regard to its parametric features with behavioral and neurophysiological approaches (Thompson and Spencer, 1966). The feasibility of the use of central mollusc neurons to study the cellular basis of learning is now well established. In particular, habituation and sensitization have been the two main processes studied in a now well known CNS of the marine mollusc *Aplysia californica* (Kandel, 1976).

In this mollusc, homosynaptic depression, i.e. a decrease in excitatory synaptic transmission, develops at the central synapses made by the sensory neurons on their target interneurons or motor cells. It is now well demonstrated that the mechanism underlying homosynaptic depression is presynaptic where a gradual decrease in neurotransmitter release is reflected in a gradual decrease of the amplitude of the postsynaptic response. This correlates well with the behavioral manifestations of habituation. Thus, the *in vitro* preparation of the whole perioesophageal ganglia has been proven to be a suitable model for the study, at cellular level, of "behavioral habituation" (Castellucci et al., 1970; Kupferman et al., 1970; Castellucci and Kandel, 1974).

The repetitive stimulation paradigms used for studying quantal transmission are likely to induce time- and use-dependent effects, since a great number of presynaptic stimulations is needed to carry out the proper statistical tests.

Also, long lasting stimulation may involve a "recruitment" of a neurotransmitter system, and the additive effects of stimulation should be identified prior to any pharmacological test. In this sense, inhibition of sensory neurons has been shown to undergo activity-dependent enhancement when action potential activity in the sensory neurons is paired with inhibitory transmitter (Small et al., 1989). It has been suggested that opiates have effects

upon mobilization of neurotransmitters (Tremblay et al., 1974) and in habituation it is known that build-up of Ca^{2+} current inactivation (Klein et al., 1980; Nelson et al., 1986) and mobilization / depletion of the neurotransmitter concur (Gingrich and Byrne, 1985; Smith and Augustine, 1988). However, a number of experiments (e.g., Tremblay et al., 1974; Christoffersen and Juel, 1979) lack the recordings of the presynaptic cell. Hence, the need for having a suitable preparation, besides that of *Aplysia*, for studying homosynaptic depression characteristics seemed worth exploring.

Another mollusc that has been used in a number of pharmacological and electrophysiological studies is the terrestrial snail *Helix aspersa* (Kerkut et al., 1975). Our interest in studying this mollusc extends to the fact that opioid actions have been demonstrated in several snail species (Leung et al., 1990; Stefano et al., 1980) and *Helix aspersa* has been proven to possess a functional opioid system (Burrowes et al., 1983; Gutiérrez y Asai, 1991; Gutiérrez, 1992; Gutiérrez, 1993) that makes it a suitable model for studying the effects of opiates on plastic changes. Thus, in this work synaptically connected neurons of the suboesophageal ganglia of the terrestrial snail *Helix aspersa* were identified *in vitro*. This identified synapse possesses some very interesting features regarding its habituation kinetics and fast neurotransmitter mobilization as well as an enkephalinergic and GABAergic presynaptic modulation (Gutiérrez, 1993).

MATERIALS AND METHODS

Perioesophageal ganglia of snails *Helix aspersa* (weighing 3 ± 0.25 g) were dissected from the animals and pinned to a Sylgard-covered bottom of a Lucite chamber (2 ml vol.). Ganglia H (left pedal) and I (right pedal) (according to the nomenclature of Kerkut et al. (1975) were removed and the thick connective sheath covering the remaining ganglia (C, left pleural; D, left

parietal; E, visceral; F, right parietal; and G, right pleural) was mechanically removed under stereoscopy microscope observation. The last sheath that covers the ganglia was removed after 7 min of enzymatic treatment (see results) with Protease Type IV (Sigma) in a Ringer solution with high Ca^{2+} (Gutiérrez, 1992). After preparation of the ganglia, they were placed in a recording chamber bathed with a Ringer solution containing [] in mM, NaCl, 100; KCl, 2.5; CaCl_2 , 2; MgCl_2 , 3; Glucose, 5; HEPES, 5, adjusted to pH 7.5. When different $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ concentration ratios were used (indicated in RESULTS) osmolarity was maintained by deletion of NaCl. Drugs used (haloperidol, naloxone, atropine and MK-801; Sigma) were diluted in the Ringer solution and applied at a constant rate.

After washing with the Ringer solution for 30 min, simultaneous intracellular recordings (WPI, KS-700 amplifier) were carried out in a pair of neurons with microelectrodes (3-10 M Ω) filled with 3 M KCl. The signals were led into a 486/25 NCR computer through a TL-3 (Axon Instruments) interface. The program pClamp (ver 5.5.1; Axon Instruments) was used for acquisition, analysis and pulse generation. The signals were also led to a chart plotter (Gramptek 7700) and a tape recorder (Vetter, 4000A) for further off-line analysis.

The stimulation of the presynaptic cell with depolarizing pulses of 100-200 ms, originated a single monosynaptic excitatory postsynaptic potential (EPSP) in the follower cell. Samples of 300 ms (with a pulse delay of 100 ms) were acquired for each stimulation. A sample period of 30 ms prior to the EPSP served as the baseline zero value. EPSPs peak amplitudes were measured using the capability of this program for averaging both individual runs or n points of each of the 1024-points acquisition sample fixed at n=7. Also, a Nicolet 1170 analyzer was used for averaging evoked EPSPs (n=8) using its pretrigger function set by the presynaptic spike.

Since either evoked EPSPs (EPSP) or spontaneously occurring EPSPs (spEPSP), were easily differentiated by eye, cursors for measurement were

manually placed in the proper region for peak detection. In no case automatic EPSP detection was used. Spontaneous postsynaptic potentials were considered as those not elicited by an action potential of the recorded presynaptic cell, however we cannot discard that they could be elicited by an action potential of other cell. Amplitude histograms were constructed and m , the average number of quanta making up an evoked EPSP was determined assuming a Poisson distribution, where m is equal to the reciprocal of the coefficient of variation (CV) squared or to the square of the mean EPSP amplitude divided by the variance. In this method, CV is independent of the unit of measurement. In some experiments, m was obtained assuming that m equals the mean EPSP amplitude divided by the mean amplitude of the spEPSP where their amplitude is considered the unit of measurement. Values are expressed as mean \pm SEM.

Intracellular injections of Lucifer Yellow, fast green or Rhodamine were carried out by pressure injection and the ganglia were fixed in 4% paraformaldehyde for 3 h and exposed to salicylate methylene overnight. Photographs were taken in the same microscope used for the electrophysiological experiments (Laborlux II) prior to and in a UV microscope (Olympus) after injection.

RESULTS

A chemical monosynaptic contact was found between two neurons of the perioesophageal ganglia of the snail. The presynaptic cell is localized in the border of ganglia E and D and the postsynaptic cell is localized just above the 2 big cells (F1 and F2) of ganglion F (Fig. 1). The postsynaptic cell is more easily identifiable so it was first impaled. The presynaptic cell was then penetrated and evoked EPSPs could readily be observed in the postsynaptic cell. Under this recording conditions, E_m of both cells ranged from -53 to -65 mV and action potential height surpassed 70 mV. When changes in E_m were seen because of deterioration of either cell, the electrodes were withdrawn. Both cells

had a few spontaneous action potentials and eventually some spEPSP. The Em of both cells remained constant throughout the experiments, which usually lasted 1 - 3 hrs. The nature of the neurotransmitter used by this synapse was not be determined, although antagonists for some neurotransmitters were tested in some experiments without any effect on the EPSPs amplitudes, namely: haloperidol (n=3), MK-801 (n=2), atropine (n=3) and naloxone (n=6).

In a number of control experiments, mapping of the region of the presynaptic cell was carried out in order to detect a nearby cell that could also have contact with the F ganglion cell, thus giving the possibility of recording distinct synapses throughout the experiments. No other cell in the vicinity produced PSPs on the postsynaptic neuron. It is noteworthy to point out that when the enzyme treatment exceeded 8 min, no postsynaptic responses could be observed. Also, when no protease treatment was used, it was rather difficult to record this synapse since mechanical withdrawal of the last thin tissue sheath could damage either cell.

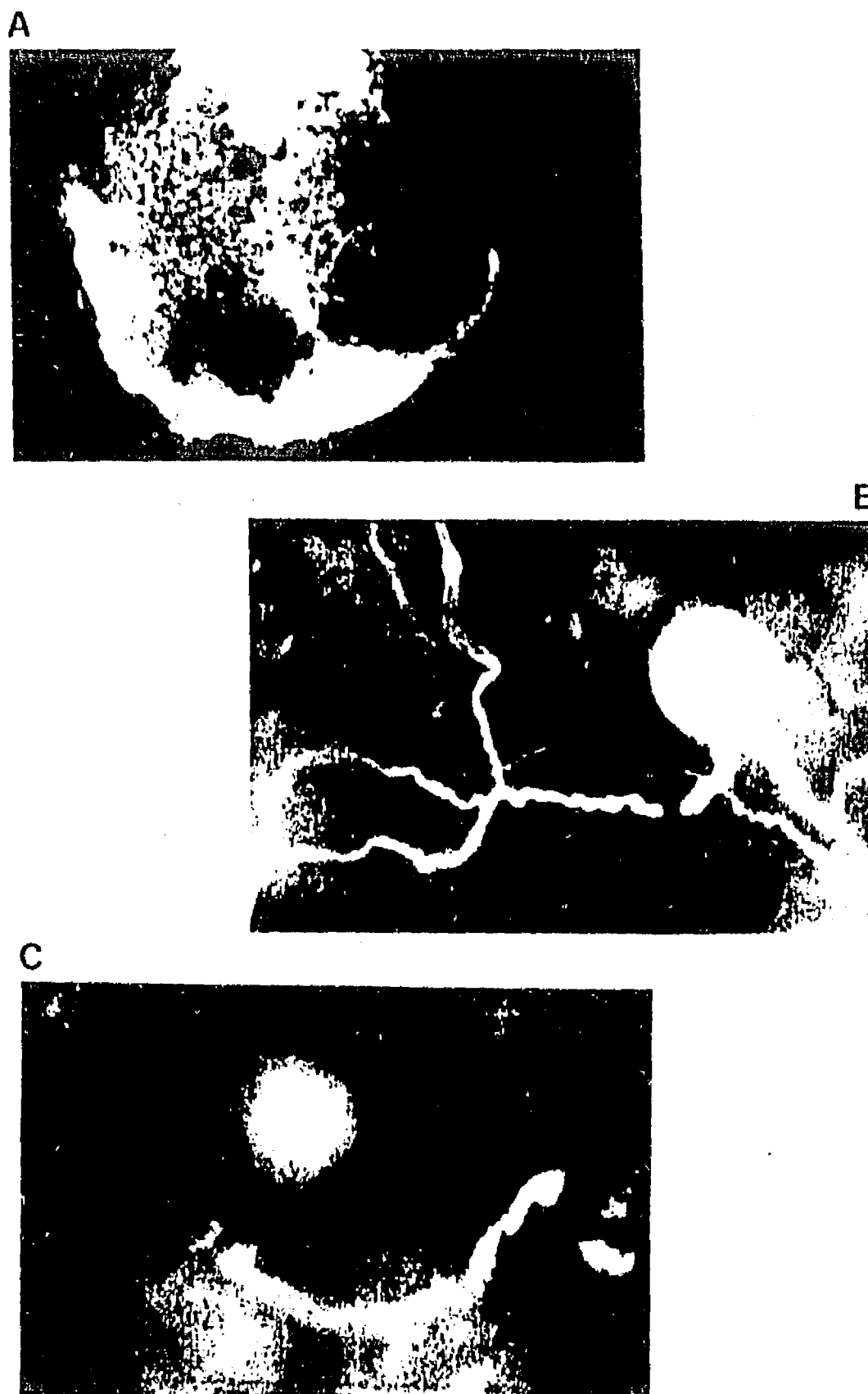


Fig. 1. Localization of the presynaptic and postsynaptic cells in the suboesophageal ganglia of *Helix a.* A. shows the suboesophageal ganglia as seen in the recording microscope after both cells were injected with fast green. Presynaptic cell in ganglia E (left), postsynaptic cell in ganglia F (right). B. shows the postsynaptic cell injected with Lucifer yellow and C. shows a magnification of a double exposure in which the presynaptic cell was injected with Rhodamine. Notice the axon of the postsynaptic cell close to the presynaptic neuron but at a different depth. Photographs B and C were taken under UV observation with appropriate filters.

In order to assess the monosynapticity of the connection, as well as the chemical nature of the synapse, the following criteria were met:

a) The intracellular injection of CsCl through the recording electrode broadens the action potential, and augments the amplitude and duration of the postsynaptic potential (Fig. 2b). During this procedure, no change in the latency of the evoked EPSPs was observed.

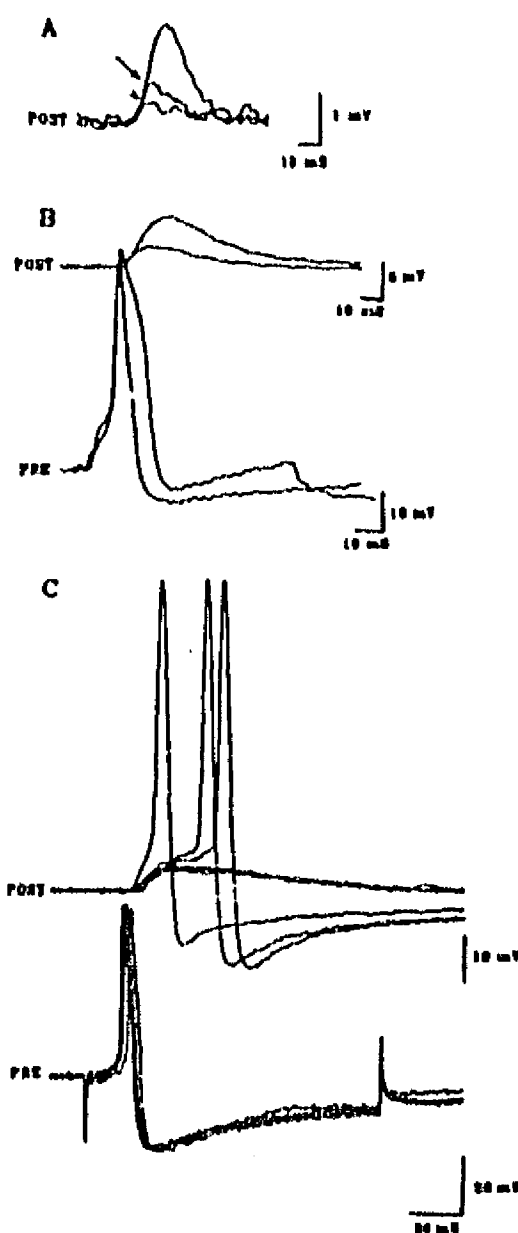


Fig. 2. Criteria for monosynapticity of the connection. From top to bottom, A shows superimposed EPSPs during control Ringer superfusion and at two different times during high Mg^{2+} Ringer superfusion (arrows); B shows action potentials evoked at control release level and after loading the presynaptic cell with CsCl; C shows 6 superimposed traces of the pair of cells recorded at normal release levels.

b) The increase of $Mg^{2+}:Ca^{2+}$ ratio in the perfusion fluid, which increases the threshold of neurons and reduces the likelihood of interneurons' firing, did not alter the latency of the EPSPs (see Fig. 2a).

c) The follower cell presented an EPSP for every action potential of the presynaptic cell, either induced by a depolarizing pulse or spontaneously fired, at normal levels of transmitter release (see Fig. 2c).

d) The stimulation of the postsynaptic cell did not cause any concomitant change of the membrane potential of the presynaptic neuron neither with hyperpolarizing nor depolarizing pulses. The firing of action potentials of the postsynaptic neuron did not produce EPSPs in the presynaptic cell (see Fig. 3).

e) The intracellular injection of Lucifer yellow, which is known to pass through gap junctions, was not found in the other neuron or axon (Fig 1).

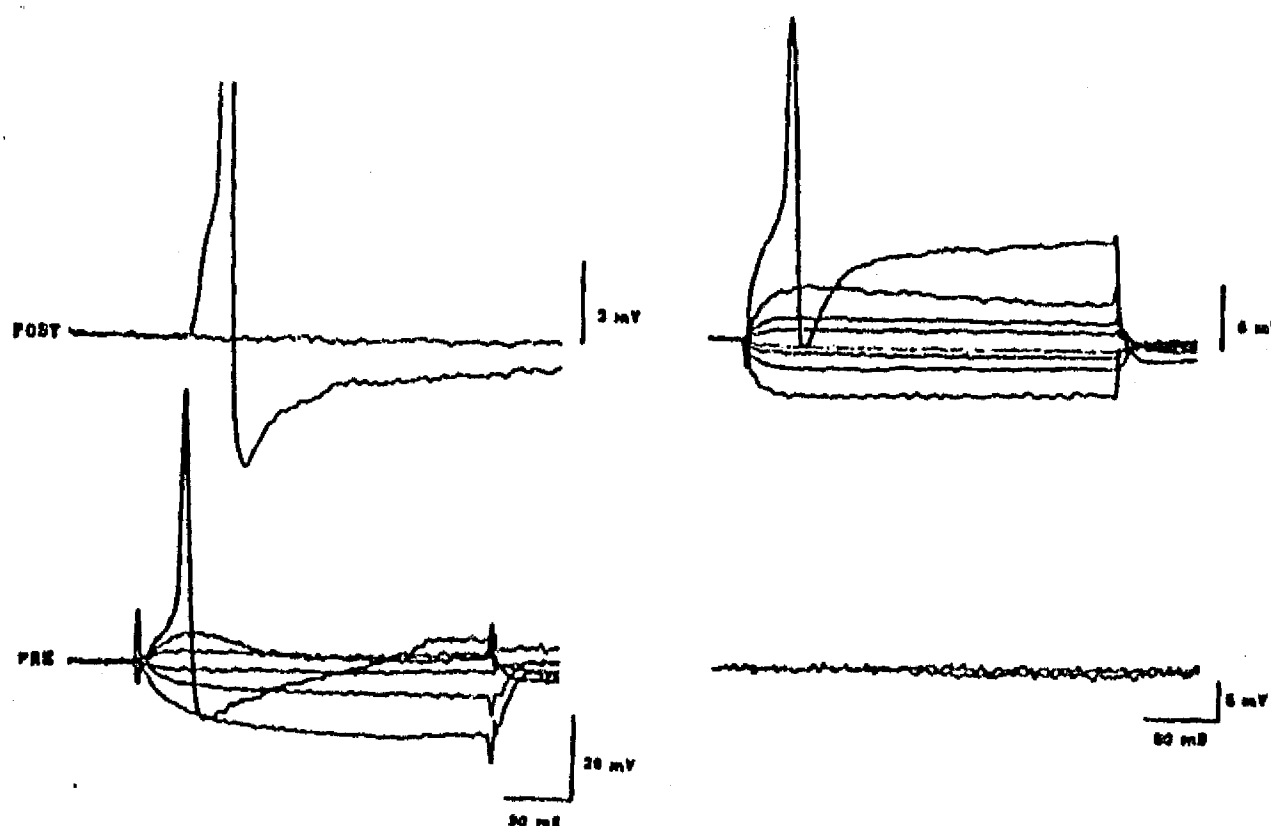


Fig. 3. Presynaptic action potential evokes an action potential in the postsynaptic neuron. Hyperpolarizing pulses of the presynaptic neuron or either hyperpolarizing or depolarizing pulses in the postsynaptic cell do not change membrane potential of the other neuron.

The repetitive stimulation of the presynaptic neuron with interstimulus intervals (ISI) of 2, 5, 7 and 10 s led to short term depression -homosynaptic depression. A characteristic recording is shown in Fig. 4. Figure 5 depicts a characteristic experiment in which 2 consecutive training sessions with an ISI of 5 s and a 25 s rest between them were delivered. In the second series, habituation is achieved at a faster rate.

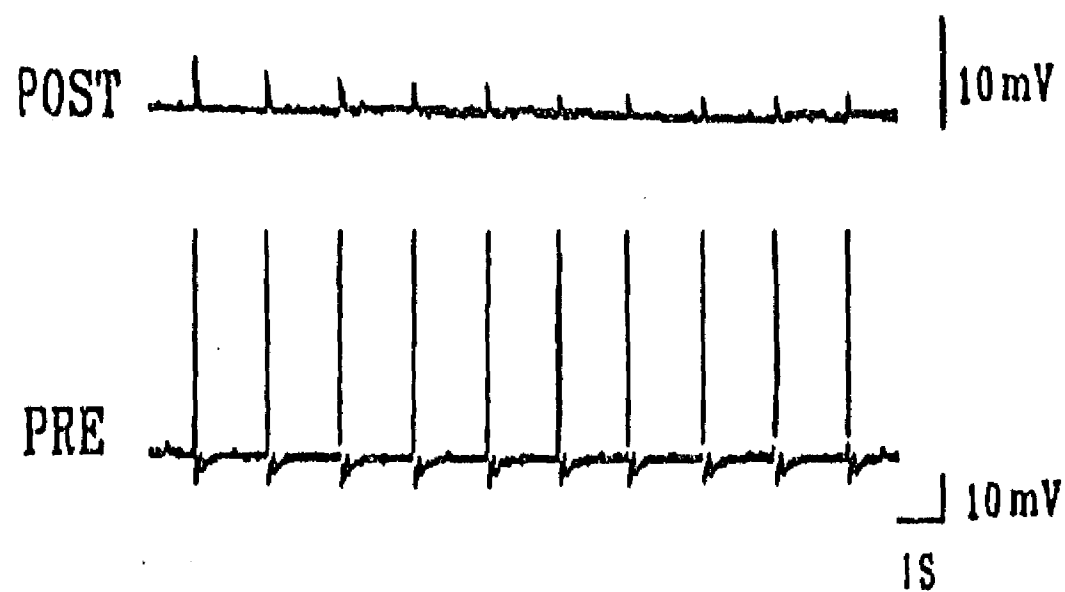


Fig. 4. Simultaneous recording of pro and postsynaptic cells during an habituation series with an interstimulus interval of .5 Hz.

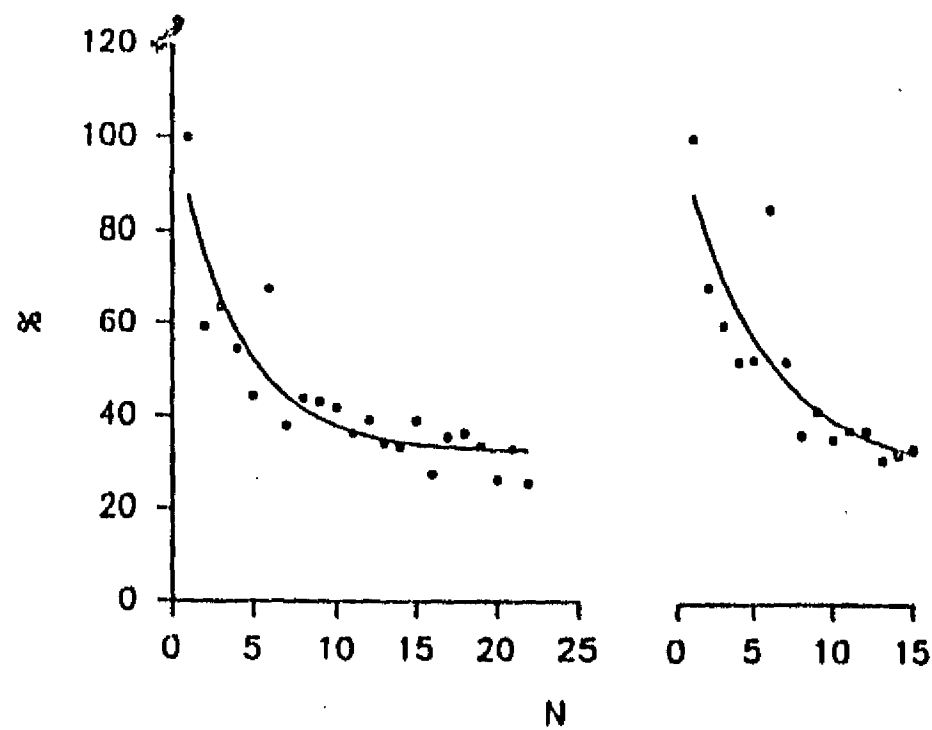


Fig. 5. Short term depression of the EPSPs during two habituation series with an ISI of 5 s separated by a resting period of 25 s. Notice the complete recovery of the EPSPs' amplitude. Abscissae: N, number of stimuli; Ordinates: % amplitude decrement compared to the first EPSP.

The continuous stimulation of the presynaptic cell, in order to obtain hundreds of EPSPs (massed stimulation), produced a profound depression of the EPSPs reaching up to 15-20% of their initial value after 150-200 stimulations ($n=8$) and then maintains a plateau level in which the only changes are occasional failures of the response. This depression can be reversed spontaneously if proper rest time is provided. The degree of the recovery is proportional to the resting time. The repeated reestablishment of the stimulation protocol produced faster rehabituation.

Tests for dishabituation -spontaneous recovery- were carried out during STD and at different moments of the massed stimulation, i.e. at different times during the experiments when more than 200 stimuli were delivered. After STD, resting periods of 5 times ISI produced the first evoked EPSP of the next series to recover (Fig. 5), however, consecutive habituation-dishabituation series in the

long-lasting experiments led to habituation of dishabituation (see Fig. 6).

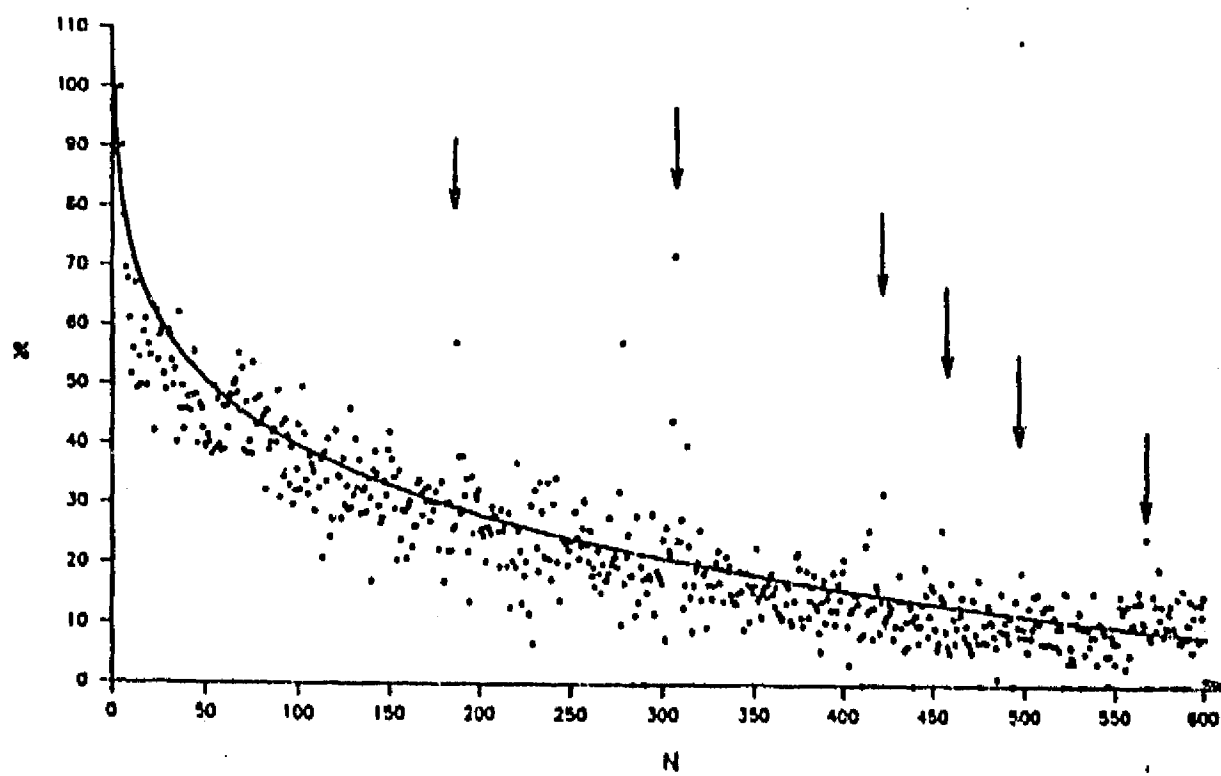


Fig. 6. Profound habituation of the EPSPs with massed stimulation; ISI was 5 s. Arrows indicate times at which resting periods of 25 s were delivered. Repetition of these resting periods led to their habituation (habituation of dishabituation). Abscissae: N, number of stimuli; Ordinates: % amplitude decrement compared to the first EPSP.

A complete recovery of the EPSPs after massed stimulation could be obtained after 2 min resting period (Fig. 7).

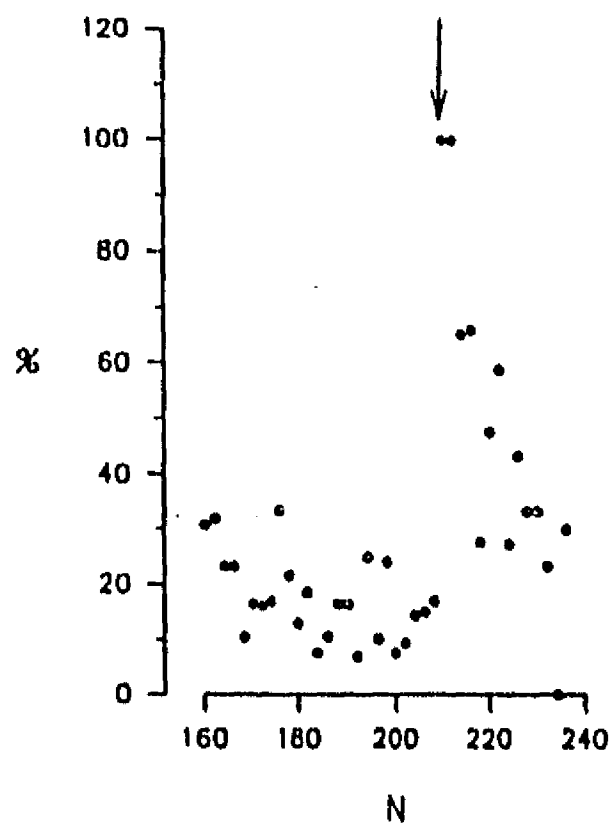


Fig. 7. Reestablishment of the stimulation protocol (ISI 5 s) after a resting period of 2 min (arrow) produced spontaneous recovery with the elicitation of two action potentials (dishabituation) and rapid rehabilitation of a fully habituated synapse. Abscissae: number of stimuli; Ordinates: % amplitude decrement compared to the first EPSP.

The construction of amplitude histograms of the evoked EPSPs amplitudes showed that the distribution obtained after a few hundreds of evoked EPSPs follows a multimodal distribution. The average value of the less detectable EPSP (q) was of 0.33 ± 0.045 mV obtained throughout 19 experiments. The mean value of q obtained by analyzing spEPSPs was 0.4 mV with a mean σ^2 of 0.02 ($n=4$). Figure 8 shows the distribution of the values of q and m of the whole set of experiments.

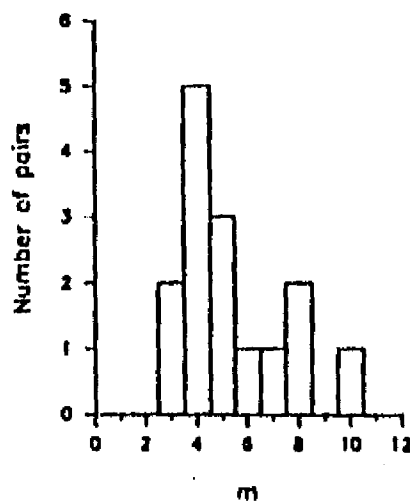
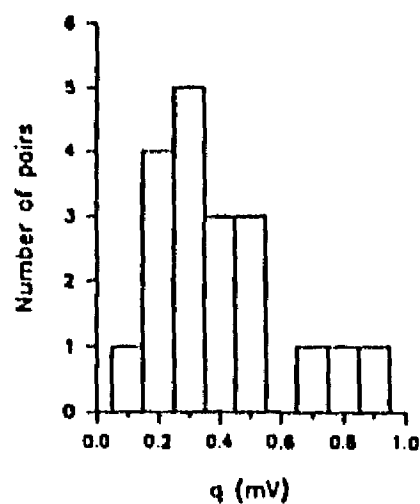


Fig. 8. Upper histogram shows the number of experiments (ordinates) in which each q value, less detectable EPSPs (abscissae) was obtained. Mean was $q = 0.33 \pm 0.045$ mV obtained throughout 19 experiments. Lower histogram shows the number of experiments (ordinates) and the values of quantal content (abscissae) in control situation. Mean was $m = 4.88 \pm 0.56$ obtained throughout 16 experiments.

When analyzing regions of the habituating curve, a continuous shift of the amplitude distribution toward lower values is uncovered as habituation evolves. The last region values, i.e. the lowest values, roughly coincided with the amplitude distribution seen for the spEPSPs. The progressive shift to the left of the peaks of the successive distributions obtained as habituation evolved was in steps that roughly resemble the value of the peak of the spEPSP (Figs. 9 and 10).

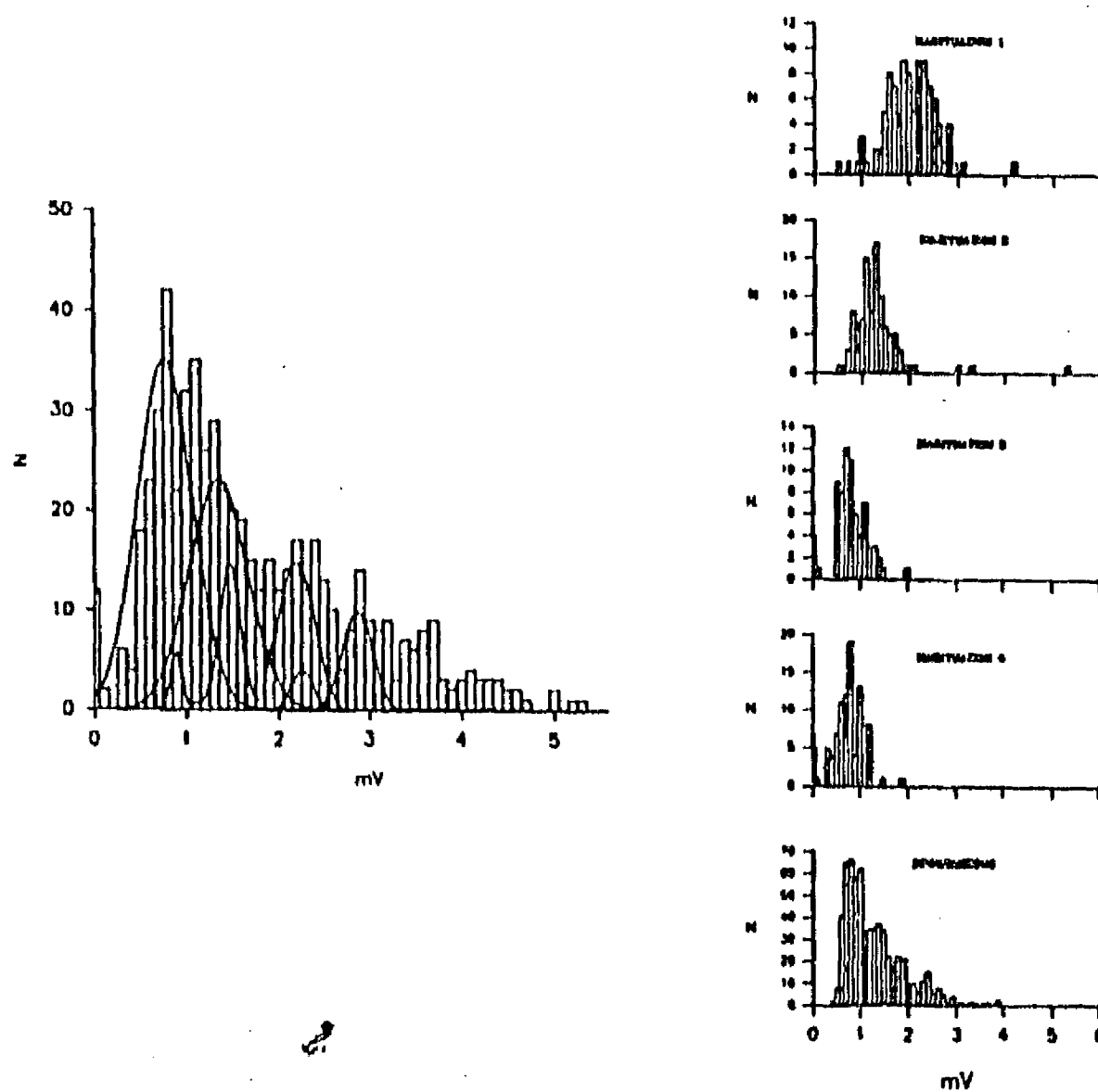


Fig. 9. On the left, distribution of the evoked EPSPs amplitudes of the whole experiment and, on the right, at different levels of habituation of the experiment depicted in Fig. 6. Notice the shift of the distributions to the left as habituation evolves. Normal curves in the histogram on the left were fit for the histograms on the right and superimposed on the corresponding mean value. Distance between peaks coincided with the first peak of the spontaneous EPSPs. Histogram at the bottom (SPONTANEOUS) depicts the distribution of the spEPSP throughout the whole experiment. Values for m and p are: Habituation 1, $m=2.74$, $p=.35$; Habituation 2, $m=1.7$, $p=.26$; Habituation 3, $m=1.02$, $p=.16$; Habituation 4, $m=.96$, $p=.14$; Spontaneous, mean $.74$ mV, $\sigma^2=.2$. Mean of the first normal curve $.71$ mV, separation between normal curves $.69$ mV.

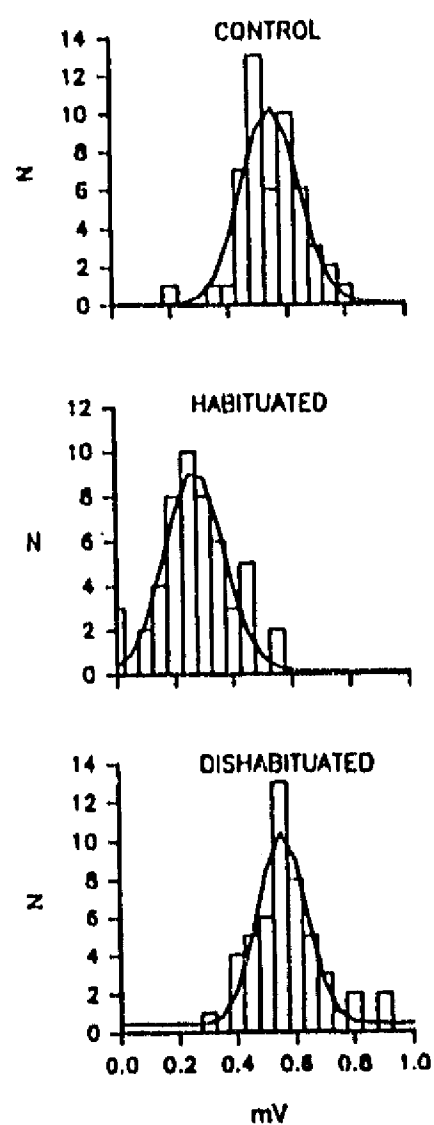


Fig. 10. Distributions of the evoked EPSPs amplitudes of an experiment at low release levels ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+} = 1:8$). The value of the shift to the left of the habituated sample coincides with that of its mean.

The values of quantal content (m) obtained throughout the experiments are summarized in Fig. 8. Average m in control situation was of 4.88 ± 0.56 . As expected, a consistent decrement of m during habituation was observed (Fig. 11). The average m obtained after "full" habituation was of 1.23 ± 0.172 ($n=7$).

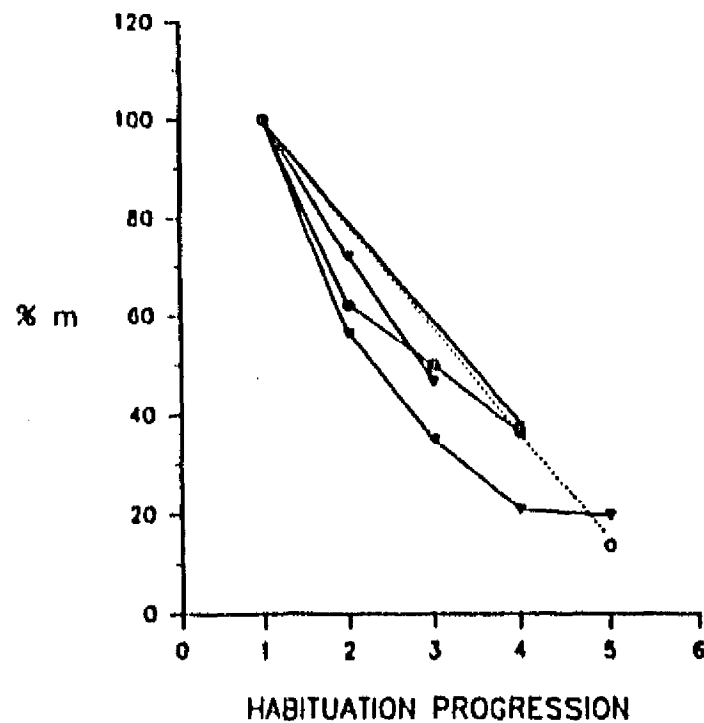


Fig. 11. Decrement of m (normalized) in five experiments during habituation. Filled triangles correspond to the experiment in Fig 6.

DISCUSSION

The present work describes a new interganglionic excitatory chemical synapse between two identified neurons of the ganglia E and F of the periesophageal ring of *Helix aspersa* by using simultaneous intracellular recordings, being the neuron in E ganglion the presynaptic cell and that in F ganglion the postsynaptic or follower cell. This synapse met well the criteria for a chemical synapse. However, the nature of the neurotransmitter used by this synapse is not known, although haloperidol, MK-801, atropine and naloxone were tested in some experiments without any effect on the EPSPs amplitudes.

Since the reversal potential could not be found at very depolarized values as measured in the soma, and the axon of the postsynaptic cell passes very closely to the presynaptic neuron, the synaptic contact might be within the

neuropil of ganglia E or close to the presynaptic cell, thus, changes of E_m produced by current pulses in the postsynaptic soma might not reach the same value at the site of the synapse.

Although the physiological function of these cells has not been disclosed, the habituation-dishabituation kinetics of this newly described synapse possesses some interesting features. Repeated stimulation of the presynaptic cell led to homosynaptic depression. Short time depression followed the same time course of that described for the sensorimotor synapse in *Aplysia* (Castelluci and Kandel, 1974) and the one obtained by repeatedly stimulating a nerve trunk in *Helix* (Christoffersen and Juel, 1979) and habituation could also be obtained at low levels of release.

However, the present results differ from those in *Aplysia* in some aspects. In the synapse here described, spontaneous recovery could be achieved after a training session leading to STD if a resting period of 25 s is provided. Thus, depression is not so long lasting as in *Aplysia* which needs several minutes to recover and in which STD is capable to transfer into long term depression (LTD). These results also differ from other experiments of homosynaptic depression carried out on immature spinal cord (Lev-Tov and Pinco, 1992) which have shown that several minutes are needed to obtain complete recovery of a habituated EPSP. Also, in the synapse here described, after massed stimulation a resting period of 25 s produced a partial recovery of the EPSPs. Complete recovery of the EPSPs' initial value could be obtained after 2 min of rest and then rehabituated with a steeper slope.

This rapid recovery is related to the fast onset or increased capability of neurotransmitter mobilization in this synapse. When a slow stimulating paradigm is used, depletion dominates over mobilization at high levels of release and the reverse holds at low levels of release. In the sensorimotor synapse of *Aplysia*, depression occurs at all levels of release, thus it is likely that synapses of the sensory neurons are not as capable of mobilizing transmitter in response to

repeated stimulation as are most other synapses. Also, the sensory neuron does not undergo facilitation, thus there is no activity-dependent enhancement of mobilization. This explains why several minutes of rest are required for recovery of normal transmission following a habituation training session of 10 to 15 stimuli (Kandel, 1976). Lev-Tov and Pinco (1992) proposed that the prolonged EPSP depression seen in the monosynaptic EPSPs of the immature spinal cord could be due to a frequency-dependent reduction in the efficacy of the transmitter release machinery of the synapse by either partial depletion of synaptic vesicles and/or inactivation of presynaptic release sites following an excessive release of transmitter. These authors explain the differences in the time course between adult and neonatal types of depression by a smaller population of synaptic vesicles or the releasable pool of vesicles in the neonatal synapse, to slower recycling rates of synaptic vesicles following release, or partial filling of synaptic vesicles, or perhaps the immature properties of the developing synapses in the neonatal rat.

Since the experiments here presented show that recovery of normal transmission, even after profound habituation, can be obtained after 2 minutes of rest, one can think that mobilization of neurotransmitter is either faster than the one seen in *Aplysia* and the immature spinal cord, or the activity-dependent mobilization mechanism in *Helix* is more effective, at least in this synapse, in which no characterization of its sensory or motor involvement has been carried out.

Mobilization of transmitter by impulse activity is thought to be due to an accumulation of Ca^{2+} in the terminals following its entry with impulse activity (Katz and Miledi 1968; Rahaminoff, 1974). During habituation, it has been demonstrated that there is a build-up of Ca^{2+} current inactivation (Klein et al., 1980; Nelson et al., 1986) that does not depend on intracellular Ca^{2+} accumulation (Swandulla et al., 1991) but on a direct modulation upon Ca^{2+} channels. Also, mechanisms for mobilization/depletion of the neurotransmitter

concur (Gingrich and Byrne, 1985; Smith and Augustine, 1988). Then, Ca^{2+} -dependent mobilization might decline and the probability of release is reduced, as Castellucci and Kandel (1974) have demonstrated.

The present work shows that, under normal release conditions, habituation reduces m as the process evolves until a distribution of amplitudes of the very habituated EPSPs is similar to that obtained for spEPSP and under low release conditions (see Fig. 10). This reduction of m might be due to a decreased probability of release since spontaneous recovery could be elicited at any time after habituation, thus, depletion cannot account for these observations. The less detectable EPSP, as shown by the measurement of spEPSPs, does not change during the habituation process. However, it is difficult to rule out the possibility that what we call spEPSP could not be all spontaneously released from the recorded presynaptic cell. The evoked EPSPs of experiments under low-release conditions show the same mean value (Fig. 10) than that obtained for the spEPSP, which had a low variance.

The delivery of a large number of presynaptic stimuli in order to have enough observations to carry out statistical analysis is very likely to produce use-dependent effects upon synaptic transmission. In this sense, Edwards et al. (1990) noticed that larger sample sizes utilized for a given cell analysis allowed a smaller quantal size to be distinguished. This observation has not only statistical implications in that a high number of lower amplitude PSPs is added to yield a clear first peak in a histogram, but that continued stimulation shall be given until quantum size EPSPs appears (Edwards et al., 1990).

It is noteworthy to point out the high value of the quantal size or "less detectable EPSP" (Kuno, 1964) which coincides with others previously reported (Kuno 1964; Macdonald and Nelson, 1978; Hackett et al., 1989). The analysis of spEPSP and the graphic determination of the quantal size coincided, both at normal and low levels of release. However, cable filtering that can undergo a signal originated from a very distant origin from the site of recording cannot be discarded as a cause for lack of detection of smaller signals.

A question that could be posed upon the results here presented is whether during long lasting recordings, a run down of the response due to biological deterioration could account for the present observations. This seems unlikely since E_m of both cells remained unchanged throughout the recording sessions and spontaneous recovery could be obtained at any time if proper rest was provided, even if the EPSPs were fully habituated. Moreover, the frequency and amplitude of spEPSP were not reduced as habituation evolved. This fact rules out the possibility of complete vesicle depletion or of postsynaptic receptor desensitization (Glanzman and Thompson, 1980). The properties of this synapse make this preparation a useful tool for studying neurotransmitter release and homosynaptic depression kinetics, and heterosynaptic modulation.

REFERENCES

- 1 Burrowes, W. R., Assanah, P. & Stefano, G. B. (1983). Behavioral effects of opiates on the land snail *Helix aspersa*. *Life Sci.*, 33 Sup. I, 381-384.
- 2 Castellucci, V. F. & Kandel, E. R. (1974). A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*. 71 , 5004-5008.
- 3 Castellucci, V. F., Pinsker, H., Kupfermann, H. I. & Kandel, E. R. (1970). Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*. 167, 1745-1748.
- 4 Christoffersen, G. R. J. & Juel, C. (1979). Synaptic depression in *Helix pomatia*. I. A presynaptic model. *Comp. Biochem. Physiol.* 62A, 611-619.
- 5 Edwards, F. A., Konnerth, A. & Sakmann, B. (1990). Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J. Physiol.* 439, 213-249.
- 6 Gingrich, K. J. & Byrne, J. H. (1985). Simulation of synaptic depression, posttetanic potentiation, and presynaptic facilitation of synaptic potentials from sensory neurons mediating gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 53, 652-669.
- 7 Glanzman, D. L., & Thompson, R. F. (1980). Alterations in spontaneous miniature potential activity during habituation of a vertebrate monosynaptic pathway. *Brain Research*. 189, 377-390.
- 8 Gutiérrez, R. (1992). Effects of naloxone on membrane potential of identified neurons of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C, 425-431.
- 9 Gutiérrez, R. (1993). Synaptic interactions between identified neurons of *Helix aspersa*. II. Concurrent enkephalinergic and GABAergic presynaptic inhibition. Accompanying paper.
- 10 Gutiérrez, R. & Asai, M. (1991). IR-Met and IR-Leu-enkephalin content in the perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*. Seasonal variations. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 609-613.

- 11 Hackett, J. T., Cochran, S. L. and Greenfield, Jr., L. J. (1989). Quantal transmission at Mauthner axon target synapses in the goldfish brainstem. *Neuroscience* 32, 49-64.
- 12 Kandel, E. R. (1976). *Cellular Basis of Behavior*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- 13 Katz, B., & Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol. (London)*. 195, 481-491.
- 14 Kerkut, G. A., Lambert, J. D. C., Gayton, R. J., Loker, J. E., & Walker, R. J. (1975). Mapping of nerve cells in the suboesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 50A, 1-25.
- 15 Klein, M., Shapiro, E. & Kandel, E. R. (1980). Synaptic plasticity and the modulation of the Ca^{2+} current. *J. exp. Biol.* 89, 117-157.
- 16 Kuno, M. (1964). Mechanism of facilitation and depression of the excitatory synaptic potential in spinal motoneurons. *J. Physiol.* 175, 100-112.
- 17 Kupfermann, I., Castellucci, V., Pinsker, H. & Kandel, E. (1970). Neuronal correlates of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*. 167, 1743-1745.
- 18 Leung, M. K., Boer, H. H., van Minnen, J., Lundy, J. & Stefano, G. B. (1990). Evidence for an enkephalinergic system in the nervous system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Brain Research*, 531, 66-71.
- 19 Lev-Tov, A. & Pinco, M. (1992). In vitro studies of prolonged synaptic depression in the neonatal rat spinal cord. *J. Physiol.* 447, 149-169.
- 20 Macdonald, R. L. & Nelson, P. G. (1978). Specific-opiate-induced depression of transmitter release from dorsal root ganglion cells in culture. *Science*. 199, 1449-1451.
- 21 Nelson, P. G., Jia, M. & Neale, E. A. (1986). Regulation of calcium currents and synaptic transmitter release. In *Experimental Brain Research, Series 14*, pp.196-206, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
- 22 Rahaminoff, R. (1974). Modulation of transmitter release at the neuromuscular junction. In *The Neurosciences: Third Study Program*, (ed. F. O. Schmitt and F. G. Wordon). pp. 943-952, Cambridge, Mass., M.I.T. Press.

- 23 Small, S. A., Kandel, E. R. & Hawkins, E. R. (1989). Activity-dependent enhancement of presynaptic inhibition in *Aplysia* sensory neurons. *Science*. 243, 1603-1606.
- 24 Smith, S. J. & Augustine, G. J. (1988). Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends in Neurosci.* 11, 458-464.
- 25 Stefano, G. B., S.-Rózsa, K. & Hiripi, L. (1980). Actions of methionine enkephalin and morphine on single neuronal activity in *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 66C, 193-198.
- 26 Swandulla, D., Hans, M., Kipser, K. & Augustine, G. J. (1991). Role of residual calcium in synaptic depression and posttetanic potentiation: fast and slow calcium signaling in nerve terminals. *Neuron*. 7, 915-926.
- 27 Thompson, R. F., & Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol. Rev.* 73, 16-43.
- 28 Tremblay, J. P., Schlapfer, W. T., Woodson, P. B. J. & Barondes, S. H. (1974) . Morphine and related compounds: evidence that they decrease available neurotransmitter in *Aplysia californica*. *Brain Research*. 81, 107-118.

CAPITULO IV**SYNAPTIC INTERACTIONS BETWEEN IDENTIFIED NEURONS OF *HELIX*
ASPERSA. II. CONCURRENT ENKEPHALINERGIC AND
GABAERGIC PRESYNAPTIC INHIBITION**

SUMMARY

Key words: *Helix*; Homosynaptic depression; Presynaptic inhibition; Quantal analysis; Opioid; GABA; Synaptic transmission.

It has been proven that opioid peptides are able to reduce neurotransmitter release in several vertebrate preparations and it has been suggested that opiates can decrease transmitter availability in a mollusc preparation. Opioid peptides and another inhibitory neurotransmitter, GABA, were tested in *Helix aspersa*, that has a functional opioid system, to see if they had any participation in synaptic modulation. Both neurotransmitters decreased the amplitude of evoked EPSP and facilitated homosynaptic depression, that was proved to be induced by inhibiting neurotransmitter release. The reduction of the EPSPs was independent on previous activity of the synapse since it was observed both, before and after profound habituation. Spontaneous release was not affected. This results demonstrate a physiological action of opioid peptides in the snail *Helix aspersa* and suggest that Met-enkephalin and GABA might not be directly reducing neurotransmitter availability but reducing neurotransmitter evoked release by decreasing the probability of release.

INTRODUCTION

It is now accepted that opioid peptides can diminish the release of neurotransmitters, and this might account for presynaptic inhibition (Jessell and Iversen, 1977; Macdonald and Nelson, 1978; Mudge et al., 1979). Opioid actions lie on either an activation of an outward K^+ current or on a reduction of an inward Ca^{2+} current (Mudge et al., 1979; Dunlap and Fischbach, 1981; Macdonald and Werz, 1986; North and Williams, 1985; Werz and Macdonald, 1983).

Acting on terminal receptors, this may lead to a reduction of transmitter release, as it has been shown in *Aplysia*. Besides, a reduction of transmitter supply to the pool available for release has been suggested (Tremblay et al., 1974). In addition, Small et al., (1989) have shown that pairing action potential activity in the sensory neuron with the administration of inhibitory transmitter produces an enhancement of inhibition.

It has been proven that snails (Leung et al., 1990; Gutiérrez, 1992; Gutiérrez and Asai, 1991) possess a functional enkephalinergic system. Also, it has been shown that some cells exhibit an enhancement of the number and amplitude of spontaneous EPSPs after naloxone perfusion, suggesting a presynaptic action for opiates (Gutiérrez, 1992). The aim of this work was to test directly this idea using an identified synapse (Gutiérrez, 1993) and to study whether presynaptic inhibition or a reduction of the supply of transmitter accounted for their inhibitory effects. Additionally, the effects of opioid peptides were contrasted with the effects of the inhibitory neurotransmitter, GABA.

MATERIALS AND METHODS

The preparation of the perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*, the electrophysiological recordings and analysis of the activity of the identified

synapse have been described (Gutiérrez, 1993).

Met-enkephalin (ME), Naloxone hydrochloride (NAL), GABA and Picrotoxin (Sigma) were diluted in the Ringer solution at the desired concentration and perfused at a constant rate of 1 ml/min.

RESULTS

In order to test first if ME, and GABA had any effect on the membrane potential of the recorded cells and to see if they affected the elicitation of postsynaptic action potentials after presynaptic stimulation, stimulation of the presynaptic cell at irregular intervals was provided to avoid habituation at high levels of release. Under these conditions every action potential of the presynaptic cell elicited an action potential in the follower neuron. Concentrations of 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 and 2 μ M of ME, 50 μ M and 1 mM of GABA, 1 and 2 μ M of NAL did not apparently change the membrane potential of any of the cells. Although it was not routinely tested (4 out of 12 experiments) no apparent changes in R_{input} were seen for ME, NAL, and GABA as assessed by constant current hyperpolarizing pulses before, during and after perfusion of the drugs.

Figure 1 depicts the effect of GABA and ME perfusion on the action potential generation in the postsynaptic cell after presynaptic stimulation. These transmitters avoided the elicitation of postsynaptic action potentials. Wash out restored the postsynaptic evoked spiking. The same protocol, i.e. irregular intervals of stimulation of the presynaptic cell was used at normal levels of release. After 2 or 3 action potentials of the postsynaptic cell, only EPSPs were observed but no depression of them occurred.

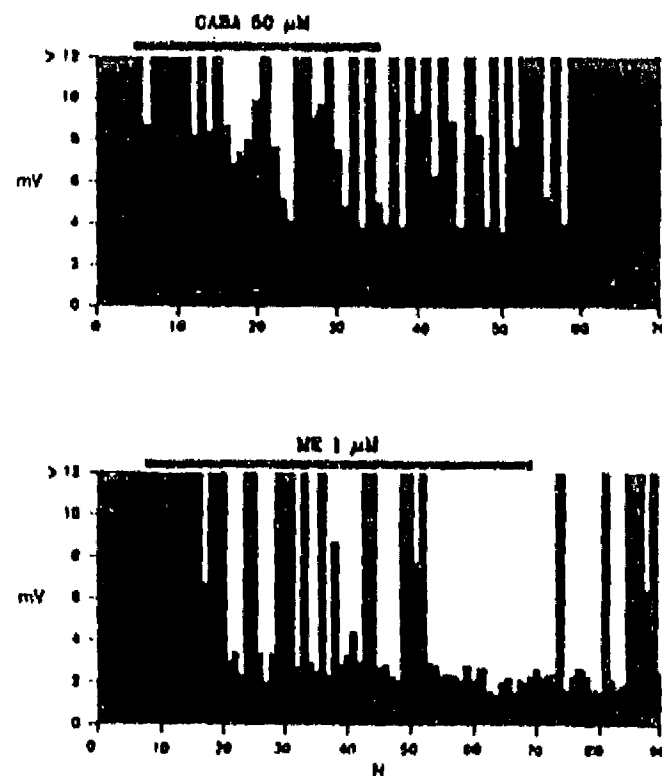


Fig. 1. Effect of GABA ($50 \mu\text{M}$) and ME ($1 \mu\text{M}$) at high levels of release during stimulation at irregular intervals to avoid habituation. Ordinates: mV, amplitude of the EPSPs. Saturated bars ($> 12 \text{ mV}$) are action potentials. Abscissae: N, number of stimulations.

Fig. 2 shows an experiment in which stimulation at irregular intervals was delivered and the effect of two concentrations of ME.

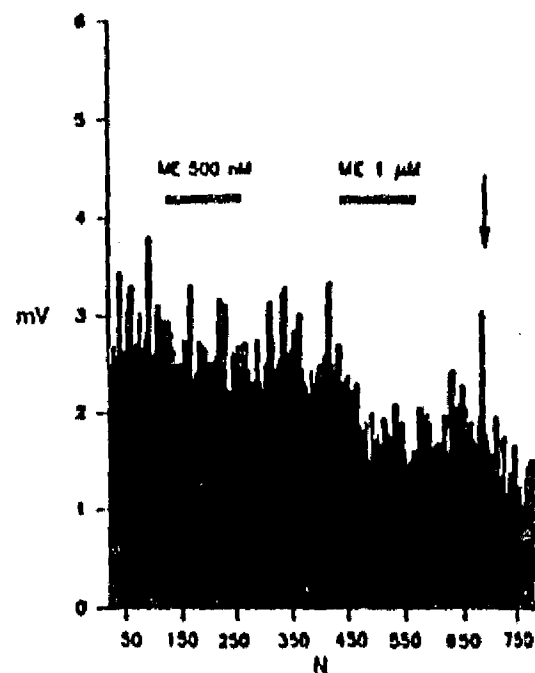


Fig. 2. Effects of two doses of ME in an experiment in which stimulation at irregular intervals was delivered. Arrow signals the onset of periodic stimulation (ISI 5 s).

The effect of GABA and ME perfused together was more pronounced than when perfusing either of them alone. This synergistic action was reversed by picrotoxin and naloxone (Figs. 3 and 4).

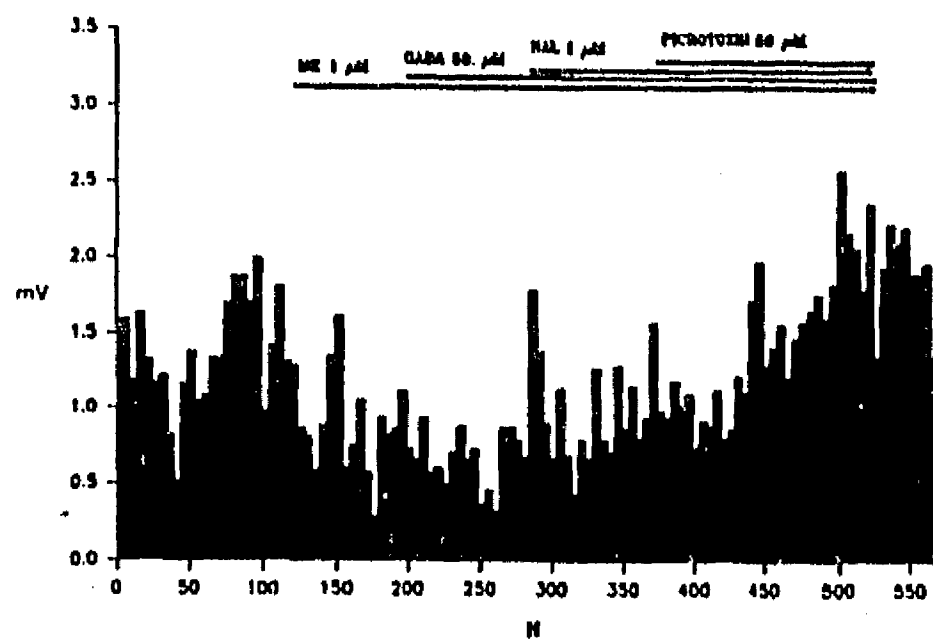


Fig. 3. Synergistic actions of ME and GABA and reversion by antagonists during stimulation at irregular intervals at normal levels of release. Each bar represents the average of 8 EPSP.

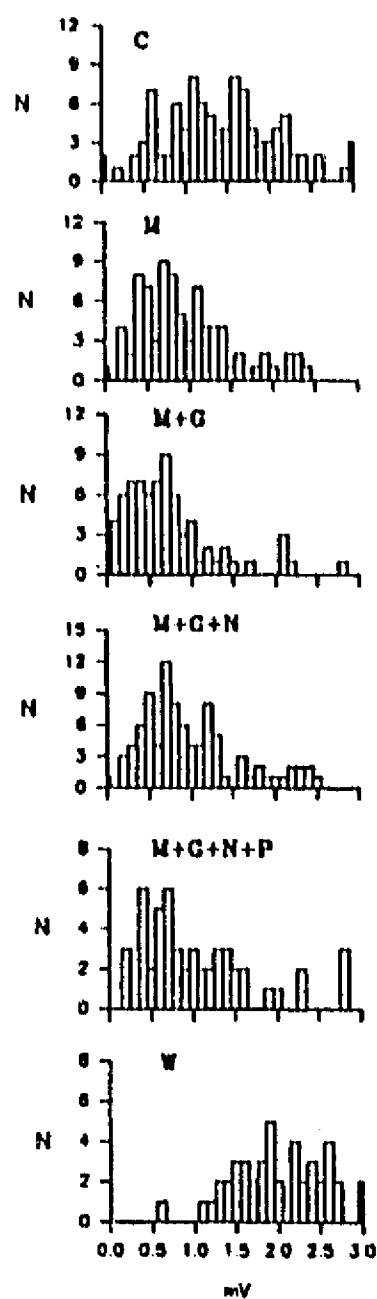


Fig. 4. Amplitude distributions of the evoked EPSPs of the experiment depicted in Fig. 3 without averaging. Notice the shift to the left during ME and GABA perfusion and its reversal by the antagonists. Quantal contents were: control, 4.08; ME, 2.46; ME+GABA, 1.32; ME+GABA+NAL, 2.62; ME+GABA+NAL+ PICRO, 2.37; WASH, 13.3.

These results suggest that ME and GABA would precipitate the habituating trend when periodic stimulation is provided. This effect is shown in Fig. 5 in which ME depresses all the EPSPs during an habituation trial. Figure 6 shows an experiment in which GABA and ME were perfused and they greatly depressed the evoked EPSPs. Complete recovery of the amplitude of the evoked EPSPs of a profoundly habituated synapse could be obtained if proper resting time was provided during ME perfusion.

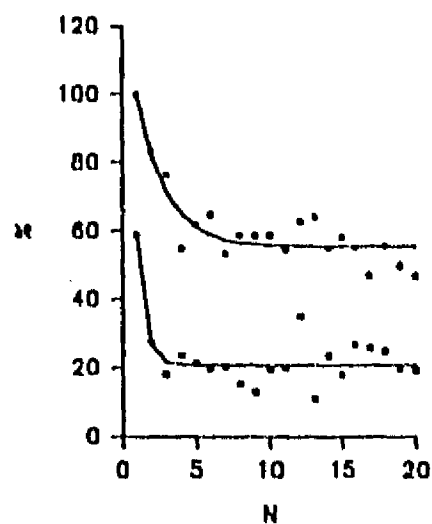


Fig 5. Short term depression of the EPSPs in control (circles) and during perfusion of $1\mu\text{M}$ of ME (squares).

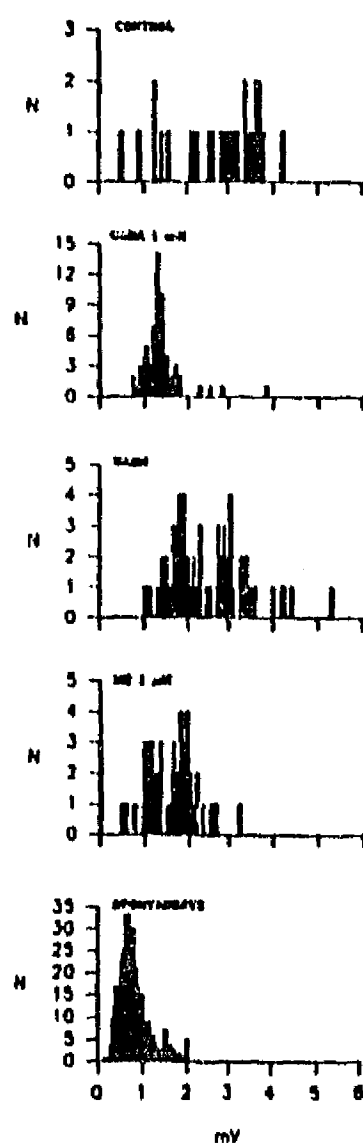


Fig. 6. Amplitude distributions of an experiment in which an habituation protocol was used. Notice how GABA (1 mM) and ME ($1\mu\text{M}$) potentiated habituation, thus shifting the distributions to lower values. Spontaneous EPSP distribution was obtained throughout the whole experiment. m and p values are: CONTROL, $m=4.05$, $p=.32$; GABA, $m=2$, $p=.15$; WASH, $m=3.56$, $p=.317$; ME, 2.21 , $p=.26$.

In three experiments, spontaneous EPSPs were analyzed in order to determine if ME of GABA affected spontaneous release or postsynaptic receptor sensitivity. No change by ME or GABA on the amplitude distributions of the spontaneous EPSPs were seen (Fig. 7).

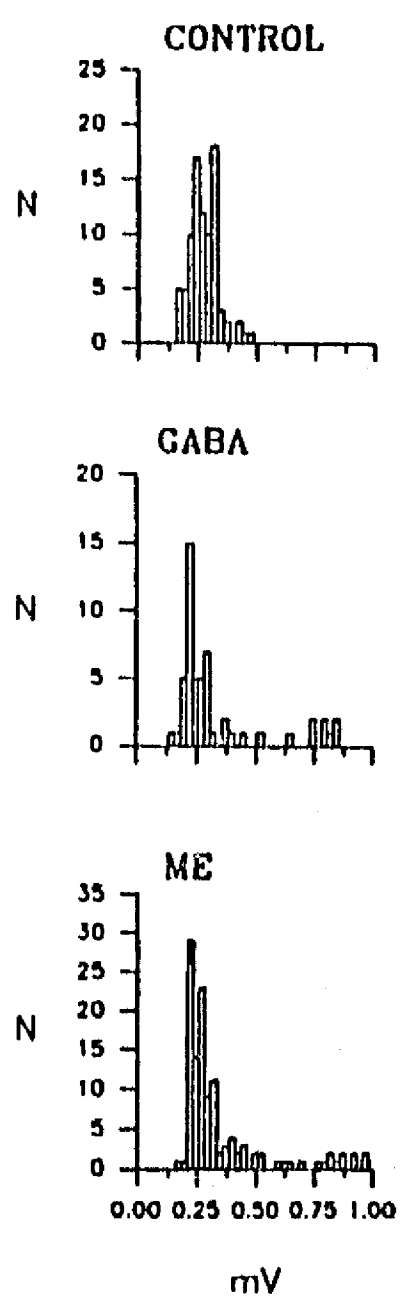


Fig. 7. Amplitude distributions of the spontaneous EPSPs during control, GABA and ME perfusion. No change is apparent during drug perfusion at a $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ ratio of 1:8. Means are: CONTROL, 0.26 ± 0.006 ; GABA, 0.32 ± 0.2 ; ME, 0.33 ± 0.017 (mV \pm SEM).

Naloxone alone was tested before and during habituation and no effects on the amplitude of evoked EPSPs and on membrane potential were detected.

DISCUSSION

Evidence of effects of opioid peptides on mollusc neurons is abundant (Tremblay et al., 1974; Waziri, 1976; Stefano et al., 1980; Verbny, 1985; S.- Rózsa and Dyakonova, 1989; Gutiérrez, 1992), also GABA is known to produce several effects on molluscan neuronal activity (Vehovszky et al., 1989).

This work provides evidence of a presynaptic modulation by these neurotransmitters: the results suggest that ME and GABA inhibit neurotransmitter release, and favors homosynaptic depression. This has been demonstrated in vertebrate preparations (Macdonald and Nelson, 1978; Mudge et al., 1979; Konishi et al., 1981; Werz and Macdonald, 1983; Shoffelmeer et al., 1988; Hirai and Katayama, 1988; Zhang et al., 1991; Yuan et al., 1992;).

Verbny (1985) reported that enkephalins were able to potentiate habituation in *Helix* but that of the action potentials evoked by a depolarizing pulse in the same neuron, not homosynaptic depression which comprises an inhibition of the release of neurotransmitter.

A postsynaptic action of ME and GABA is unlikely since dishabituation (spontaneous recovery) can be elicited at any time and there was no change in the amplitude distribution of spontaneous EPSP, i.e. quantal size remained unchanged whereas quantal content, m , decreased. When probability curves were constructed (Van der Kloot, 1991), the curve segment that corresponds to low values of EPSPs was the same for GABA and ME, but a change in a portion of the slope that corresponds to EPSPs

values of 2 or more quanta, was selectively affected. This might indicate that ME and GABA are not acting upon the same receptor complex, or that two different populations of release buttons are affected.

ME and GABA reduce EPSPs amplitude whether they are strongly, mildly or not habituated at all. At high levels of release and stimulating the presynaptic neuron at irregular intervals, protocol that avoids habituation, the postsynaptic cell fires for every presynaptic action potential. Under these conditions, ME and GABA perfusion prevents postsynaptic firing and only EPSPs remain. Also, as with habituation (Gutiérrez, 1993), these neurotransmitters reduce m , suggesting that neurotransmitter probability of release is affected. However, this does not discard the possibility put forward by Tremblay et al. (1974) that an exposure of the preparation to an opiate can decrease the availability of the neurotransmitter for release (although they needed 3-4 h), which certainly might have implications for opioid dependence studies.

ME and GABA might not be directly reducing neurotransmitter availability but reducing neurotransmitter output by reducing the probability of release since the effects are seen both in control condition and after affecting availability and/or mobilization through strong habituation. Also, frequency dependent supply is not affected since the effects were seen during both periodic and irregular stimulation, and spontaneous recovery could always be obtained. Although Miller (1990) has pointed out that some component of presynaptic modulation may be exerted by neurotransmitters directly on the release mechanism in addition to effects on presynaptic ion channels. In this proposal, the inhibition is achieved by some action at the level of the release apparatus itself.

It has been shown that Ca^{2+} current inactivation builds-up during habituation. Thus, Ca^{2+} dependent mobilization may decline, and also the probability of release diminishes. Activity-dependent presynaptic inhibition modulated by inhibitory neurotransmitters has been described in *Aplysia*

(Small et al., 1989). This inhibition is thought to be independent of ion fluxes through the membrane, rather this authors propose a mechanism which alters transmitter availability or the release process itself.

A mechanism of build-up of inhibition has been proposed to underlie spinal cord habituation (Pearson and MacDonald, 1973), and it has been suggested that enkephalinergic interneurons are recruited as spinal habituation evolves (Fernández-Guardiola et al., 1989). Our results rule out the possibility of the recruitment of an enkephalinergic system, thus building-up inhibition during habituation in the snail since naloxone did not modify the habituating trend.

The present work does not address the ionic nature of this inhibitory effect or if this inhibition by opiates has the same ionic dependence as that seen in vertebrates, but it does provide direct evidence that opiates can modulate synaptic release in this invertebrate as has been suggested in other invertebrates (Aiello et al., 1986; Makman, 1986). Anatomical studies in the snail by Boer et al. (1986) have found secretory granules in the axon terminals immunoreactive to ME and the amount of axo-axonal synapses that present peptide granules in the presynaptic terminal is abundant (Elekes et al., 1983).

We conclude that this inhibitory neurotransmitters might participate in presynaptic inhibition in the snail by reducing neurotransmitter output but the ionic mechanisms underlying this event need to be further investigated.

REFERENCES

- 1 Aiello, E., Hager, E., Akiwumi, C. & Stefano, G. B. (1986). An opioid mechanism modulates central and not peripheral dopaminergic control of ciliary activity in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Cell. Mol. Neurobiol.* 6, 17-30.
- 2 Boer, H. H., Geraerts, W. P. M., Schot, L. P. C. & Ebberink, R. H. M. (1986). Immunocytochemical and physiological studies on (neuroendocrine) neurons of the pond snail *Lymnaea stagnalis*, with particular reference to coexistence of biologically active peptides (BAP) and biogenic amines, to cardioactive peptides and to corelease of BAP from the ovulation hormone-producing caudodorsal cells. In *Handbook of Comparative Opioid and Related Neuropeptide Mechanisms*, G. B. Vol. I (ed. G.B. Stefano), pp. 223-241, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- 3 Dunlap, K. & Fischbach, G. D. (1981). Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurons, *J. Physiol.*, 317, 519-535.
- 4 Elekes, K., Vehovszki, A. & Salánki, J. (1983). Ultrastructure of synaptic connections of a bimodal pacemaker giant neuron in the central nervous system of *Helix pomatia L.* *Neurosci.* 8, 617-629.
- 5 Fernández-Guardiola, A., Pellicer, F., León-Olea, M., Asai, M. & Sánchez-Alvarez, M. (1989). Habituation and dehabituation of the spinal polysynaptic reflex responses: modification by naloxone and opiates and their anatomical correlates. *Neuropeptides.* 14, 115-120.
- 6 Gutiérrez, R. (1992). Effects of naloxone on membrane potential of identified neurons of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C, 425-431.
- 7 Gutiérrez, R. (1993). Synaptic interactions between identified neurons of *Helix aspersa*. I. Homosynaptic depression. Accompanying paper.
- 8 Gutiérrez, R. & Asai, M. (1991). IR-Met and IR-Leu-enkephalin content in the perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*. Seasonal variations. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 609-613.
- 9 Hirai, K. & Katayama, Y. (1988). Methionine enkephalin presynaptically facilitates and inhibits bullfrog sympathetic ganglionic transmission. *Brain Research.* 448, 299-307.

- 10 Jessell, T. M. & Iversen, L. L. (1977) Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus, *Nature (Lond.)*, 268, 549-551.
- 11 Konishi, S., Akinobu, T. & Otsuka, M. (1981). Enkephalin as a transmitter for presynaptic inhibition in sympathetic ganglia. *Nature*, 294, 80-82.
- 12 Leung, M. K., Boer, H. H., van Minnen, J., Lundy, J. & Stefano, G. B. (1990). Evidence for an enkephalinergic system in the nervous system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Brain Research*, 531, 66-71.
- 13 Macdonald, R. L. & Nelson, P. G. (1978). Specific-opiate-induced depression of transmitter release from dorsal root ganglion cells in culture. *Science*, 199, 1449-1451.
- 14 Macdonald, R. L. & Werz, M. A. (1986). Dynorphin decreases voltage-dependent calcium conductance of mouse dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, 377, 237-249.
- 15 Makman, M. H. (1986). Interaction of monoamines with opioids and related peptides, In *Handbook of Comparative Opioid and Related Neuropeptide Mechanisms*, Vol. I, (ed. G. B. Stefano). pp 263-271. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- 16 Miller, R. J. (1990). Receptor-mediated regulation of calcium channels and neurotransmitter release, *FASEB J.* 4, 3291-3299.
- 17 Mudge, A. W., Leeman, F. E. & Fischbach, G. D. (1979). Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.* 76, 526-530.
- 18 North, R. A. & Williams, J. T. (1985). On the potassium conductance increased by opioids in rat locus coeruleus. *J. Physiol.* 364, 265-280.
- 19 Pearson, J. A. & MacDonald, J. F. (1973). Habituation of the flexor reflex: inhibitory build-up or synaptic depression?. *Brain Research*, 53, 451-454.
- 20 S.-Rózsa, K. & Dyakonova, T. L. (1989). Interaction of serotonin

and leu-enkephalin on the habituating central neurons of *Helix pomatia* L. in situ and in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* 92C, 361-370.

- 21 Shoffelmeer, A. N. M., Rice, K. C., Jacobson, A. E., Van Gelderen, J. G., Hogenboom, F., Heijna, M. H. & Mulder, A. H. (1988). μ -, δ - and κ -opioid receptor-mediated inhibition of neurotransmitter release and adenylate cyclase activity in rat brain slices: studies with fentanyl isothiocyanate. *Eur. J. Pharmacol.* 154, 169-178.
- 22 Small, S. A., Kandel, E. R. & Hawkins, E. R. (1989). Activity-dependent enhancement of presynaptic inhibition in *Aplysia* sensory neurons. *Science*. 243, 1603-1606.
- 23 Stefano, G. B., S-Rózsa, K. & Hiripi, L. (1980). Actions of methionine enkephalin and morphine on single neuronal activity in *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 66C, 193-198.
- 24 Tremblay, J. P., Schlapfer, W. T., Woodson, P. B. J. & Barondes, S. H. (1974). Morphine and related compounds: evidence that they decrease available neurotransmitter in *Aplysia californica*. *Brain Research*. 81, 107-118.
- 25 Van der Kloot, W. (1991). The regulation of quantal size. *Progress in Neurobiol.* 36, 93-130.
- 26 Vehovszky, A., Bokisch, A. J., Krogsgaard-Larsen, P. & Walker, R. J. (1989). Pharmacological profile of Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors of identified central neurons from *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92C, 391-399.
- 27 Verbny, Y. I. (1985). Influence of enkephalins on plasticity of neurons of a snail. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat.* 13, 306-311.
- 28 Waziri, R. (1976). Morphine effects on cholinergic synaptic transmission in *Aplysia*: evidence for receptor blockade. *Comp. Biochem. Physiol.* 55C, 95-102.
- 29 Werz, M. A. & Macdonald, R. L. (1983). Opioid peptides selective for mu- and delta-opiate receptors reduce calcium-dependent action potential duration by increasing potassium conductance. *Neurosci. Lett.* 42, 173-178.

- 30 Yuan, X., Madamba, S. & Siggins, G. R. (1992). Opioid peptides reduce synaptic transmission in the nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.* 134, 223-228.
- 31 Zhang, C., Bachoo, M. & Polosa, C. (1991). Naloxone-sensitive inhibition of nicotinic transmission in the superior cervical ganglion of the cat. *Brain Research.* 548, 29-34.

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

La presencia de péptidos opioides y algunos efectos electrofisiológicos y conductuales de opiáceos a lo largo de la escala filogenética ha sido reportada en repetidas ocasiones (ver Capítulo I). En *Helix aspersa* no existían reportes sobre la determinación de estos péptidos en los ganglios periesofágicos y, recientemente, Leung y col. (1990) determinaron su presencia en un caracol acuático, *Limnaea stagnalis*.

La determinación que realizamos de inmunorreactividad a Metionina-encefalina (ME) y Leucina-encefalina (LE) con el uso de anticuerpos altamente selectivos a estos péptidos sugiere fuertemente la existencia de un sistema opioide endógeno cuyas concentraciones presentan variaciones durante el año de forma aparentemente estacional. Estos datos concuerdan con un estudio en el cual se demostró una variación estacional del ligado al receptor para encefalinas en el bivalvo *Mytilus edulis* (Stefano y Leung, 1986). El significado funcional de estas variaciones no se conoce, aunque los períodos en los que la proporción LE/ME es mayor coinciden con la época reproductiva del caracol (Gomot y Deray, 1987).

Nuestros datos y los reportados por Leung y col. (1990), en los que además demostró que la afinidad por el receptor δ es la más alta, demuestran la existencia de un sistema encefalinérgico en el que la ME y LE, ligandos naturales al receptor δ , parecen tener un papel fisiológico. Llama la atención, sin embargo, que hayamos encontrado una mayor cantidad de LE que de ME en todas las estructuras. Esto podría explicarse por una mayor liberación de ME o mayor biosíntesis de LE, o por ambos eventos. Sin embargo, la relación ME/LE en cerebros de ratón, rata, cobayo, conejo y porcino, en el que se describió originalmente (Hughes y col., 1975), es de 3-4 a 1 (Smith y col., 1976).

La pre-proteína que codifica ambas encefalinas en mamíferos es la Proencefalina A, que contiene 4 secuencias de ME, una secuencia de LE, una

de ME-arg⁶-gly⁷ y una de ME-arg⁶-gly⁷-leu⁸ (Noda y col., 1982; Comb y col., 1982). Por otro lado, las dinorfinas, cuyo precursor es la Prodinorfina o Proencefalina B, contienen, por lo menos, una copia de LE (Kakidani y col., 1982). El hecho de que la Proencefalina A contenga 1 secuencia de LE y la Prodinorfina contenga 3 copias de la secuencia de LE pudiera indicar que la LE puede derivarse de ambos precursores. Sin embargo, Martens y Herbert (1984) demostraron que, en *Xenopus laevis*, la Proencefalina A no contiene la secuencia para LE. Este hecho nos hace pensar que, si suponemos un continuo evolutivo, la LE en *Helix aspersa* pueda ser derivada exclusivamente de la Proencefalina B. Esta conclusión deberá ser probada experimentalmente ya que, actualmente, no se tiene evidencia de la existencia de un precursor del tipo de la Prodinorfina (Leung y col., 1990).

La determinación directa de encefalinas endógenas en *Helix aspersa*, y las evidencias electrofisiológicas que sugerían la posible participación de estos péptidos en la actividad neural en este molusco, en especial, al observar con registros intracelulares que la perfusión del ganglio neural con naloxona, antagonista a los opioides endógenos, producía un aumento en la frecuencia y amplitud de potenciales postsinápticos (PPSE) espontáneos en algunas neuronas en las que la naloxona no producía ningún cambio en el potencial de membrana (Gutiérrez, 1988; Gutiérrez, 1992) lo hacían un modelo idóneo para el estudio de la posible participación de las encefalinas en la modulación de la actividad sináptica.

En este sentido, una serie de trabajos de nuestro laboratorio habían mostrado la participación de las encefalinas en procesos plásticos como el "kindling" (estimulación subumbral iterativa que produce crisis convulsivas) o la habituación (Fernández-Guardiola y col., 1982, 1986, 1988, 1989). En estos trabajos, se puso en evidencia un papel inhibitorio de los péptidos opioides.

Sin embargo, una de las interrogantes era si la acción inhibitoria de los opioides, puesta al descubierto por los efectos de la naloxona, podía ser dependiente de la actividad previa de las sinapsis involucradas o su acción era

independiente del estado de excitabilidad previo del sistema. Quise contestar esta pregunta con un sistema sencillo, en el que había demostrado la presencia de un sistema opioide endógeno, en el que pudiera producir cambios plásticos y que me permitiera identificar los efectos pre y postsinápticos, tanto de los cambios plásticos como del posible efecto de los opioides.

La serie de evidencias experimentales en invertebrados que demuestran que los opioides producen una variedad de respuestas electrofisiológicas no han podido establecer una relación directa de su papel como neuromodulador como ha sucedido en vertebrados, de hecho, no hay estudios de los efectos de los opioides sobre sinapsis en los que se registren simultáneamente las neuronas pre y postsináptica en una preparación de invertebrado; sin embargo, en vertebrados está bien demostrado que estos péptidos inhiben la liberación de neurotransmisor de la presinapsis.

Estos trabajos en vertebrados demuestran, a nivel celular, la acción inhibitoria de los opioides agonistas a los receptores μ y δ producida por la activación de una conductancia de la membrana al potasio (Duggan y North, 1983), en tanto que los agonistas K actúan disminuyendo la conductancia al Ca^{2+} (Werz y Macdonald, 1983; Macdonald y Wertz, 1986; North y Williams, 1985), lo cual produce una disminución de la liberación de neurotransmisor de la terminal sináptica (Jessell e Iversen, 1977; Macdonald y Nelson, 1978; Mudge y col., 1979; Dunlap y Fischbach, 1981; Hirai y Katayama, 1988; Yuan y col., 1992). Otro mecanismo que ha sido propuesto para explicar el efecto de los opioides, es decir, la disminución de la liberación de neurotransmisor, es que éstos reducen la disponibilidad de neurotransmisor liberable en la terminal sináptica (Tremblay y col., 1974). Este último trabajo fue realizado en *Aplysia*.

Por tanto, en este trabajo de tesis, además de determinar la presencia de estos péptidos en el sistema nervioso de *Helix a.* hemos identificado una sinapsis química excitatoria, con registro simultáneo de las neuronas pre y postsináptica, en la que demostramos su modulación por opioides y GABA. Proponemos que los opioides producen una disminución de la liberación del

neurotransmisor de la presinapsis, debida a una reducción de la probabilidad de liberación y no a una reducción de la disponibilidad del neurotransmisor, como había sido sugerido por Tremblay y col. (1974).

El análisis de contenido cuántico es un método valioso para la determinación de los efectos pre o postsinápticos de un fármaco o procedimiento experimental que involucre cambios en la transmisión sináptica. Con base en esta metodología, se ha demostrado que la habituación y sensibilización se deben a mecanismos de depresión y facilitación presináptica respectivamente y, en ambos casos, se ha demostrado mediante análisis de contenido cuántico, que se produce una modificación en la cantidad de neurotransmisor liberado (del Castillo y Katz, 1954; Kuno, 1964; Martin y Pilar, 1964; Katz y Miledi, 1967, 1968; Wernig, 1972, Zucker, 1973; Castellucci y Kandel., 1974, 1976).

Asimismo, con esta metodología, varios autores han demostrado en vertebrados que los opioides reducen el contenido cuántico (m), lo que implica una menor liberación de neurotransmisor y, por ende, un mecanismo de inhibición presináptica (Hirai y Katayama, 1988; Konishi y col., 1981; Macdonald y Nelson, 1978).

La estimulación transmembranal repetida de la neurona presináptica, con la consecuente generación de un potencial de acción, produce un PPS en la otra neurona que va disminuyendo en amplitud conforme avanza el proceso. En este fenómeno de depresión homosináptica se ha demostrado que hay un incremento de la inactivación de la corriente de Ca^{2+} en la célula presináptica conforme avanza el proceso (Klein y col., 1980; Nelson y col., 1986), que es la responsable de que disminuya la liberación de neurotransmisor (Castellucci y Kandel., 1974). Es también sabido que la movilización del neurotransmisor a la poza liberable es dependiente de la acumulación de Ca^{2+} que entra durante los potenciales de acción (Katz y Miledi, 1968; Rahaminoff, 1974) y ésta es modificada durante la habituación (Gingrich y Byrne, 1985; Smith y Augustine, 1988).

Nuestros datos coinciden con estos cambios descritos, es decir, el

decremento de m conforme avanza la habituación, sin modificación de la amplitud del PPSE unitario (q) y, en condiciones de liberación normal, un corrimiento de los picos de los histogramas de distribución de amplitudes en pasos que se aproximan a la amplitud del potencial unitario (Edwards y col., 1990) hasta obtener una distribución normal aproximada a q . Los valores calculados para m (4.88 ± 0.56 SEM, en situación control, $n=19$ y 1.23 ± 0.172 después de habituación profunda, $n=7$) y q (0.33 ± 0.045 mV; $n=19$) coinciden con resultados previamente reportados en varias preparaciones (Kuno, 1964; Macdonald y Nelson, 1978; Hackett y col., 1989) aunque para q , son de un orden de magnitud mayor que en la sinapsis sensoriomotora de *Aplysia* (Castellucci y Kandel., 1974). Las distribuciones de amplitudes de los potenciales postsinápticos espontáneos coinciden con las obtenidas en los experimentos en los que se registraron potenciales postsinápticos provocados por la estimulación de la neurona presináptica usando un ringer con una concentración alta de Mg^{2+} y baja de Ca^{2+} , sin embargo, no podemos descartar que hayamos medido potenciales postsinápticos provocados por la activación de otra neurona presináptica.

Los experimentos de análisis de contenido cuántico requieren de la activación repetida de la sinapsis por largos periodos para obtener un número de observaciones lo suficientemente grande para permitir un adecuado análisis estadístico. En estas condiciones es muy probable que este tipo de estimulación produzca un efecto similar a la habituación o que se produzcan efectos dependientes del uso de la sinapsis.

En este sentido, hemos analizado el contenido cuántico cada cierto número de estimulaciones y después de contar con la "población estadística" completa. Conforme se avanza en el número de estimulaciones, las amplitudes de los PPSE tienden a q y el histograma de amplitudes de toda la distribución (todos los potenciales evocados) presenta un pico correspondiente a q . Esto, además de las implicaciones estadísticas, es decir, el contar con un número

grande de observaciones para tener un histograma de distribución "completo", parece ser necesario para que pueda distinguirse un cuanto suficientemente pequeño (Edwards y col., 1990).

En nuestros experimentos mostramos que cuando la sinapsis se encuentra muy habituada (más de 500 estímulos con un intervalo interestímulo de 5 segundos), es posible producir deshabitación o recuperación espontánea si se deja de estimular durante 2 minutos o más. En el caso de producir recuperación espontánea después de dar únicamente 25 estímulos, sólo se requieren 25 segundos de retiro del estímulo para que la respuesta se recupere el 100 %. Estos datos están relacionados con la capacidad de la sinapsis de iniciar o favorecer la movilización de neurotransmisor para su liberación y observamos que ésta es más rápida que la reportada en *Aplysia* (Kandel, 1976) y en médula espinal de rata neonata (Lev-Tov y Pinco, 1992). Lev-Tov y Pinco (1992) explican esta depresión tan duradera de los potenciales postsinápticos con base en una reducción de la eficiencia de la maquinaria de liberación del neurotransmisor por un vaciamiento parcial de las vesículas sinápticas y la disminución de la velocidad de vesiculación o la inactivación de los sitios de liberación después de la liberación excesiva de neurotransmisor.

Por otro lado, la acción de los opioides en esta sinapsis que describimos sugiere un mecanismo similar a la reportada en vertebrados. Su efecto en condiciones en las que la estimulación de la presinapsis no produce habituación y en condiciones en las que la probabilidad de liberación es alta, evita la aparición de potenciales de acción provocados en la neurona postsináptica o reduce la amplitud de los PPSE. Por tanto, bajo un protocolo de estimulación para producir habituación, se favorece o facilita la depresión homosináptica. Esto sugiere, entonces, que su efecto es independiente de los cambios en la disponibilidad del neurotransmisor producidos por la actividad repetitiva, como había sido sugerido por Tremblay y col. (1974) y proponemos que su acción es más bien sobre la probabilidad de liberación. Estos autores además sugirieron que no sólo la movilización dependiente de la actividad sino la movilización que

abastece a la poza liberable de neurotransmisor y que no es dependiente de la actividad se ven afectadas. Vale la pena indicar que los efectos que estos autores describieron fueron observados 3 a 4 horas después de comenzada la perfusión con el opioide. En el caso de los experimentos que presentamos, la inhibición es casi inmediata y reversible (tanto por lavado como por el uso de antagonistas como naloxona y picrotoxina). Este mismo efecto inhibitorio de los opioides fue observado con la aplicación de GABA, y al aplicarlos juntos, se observó un sinergismo..

El análisis de contenido cuántico demostró un efecto presináptico ya que m disminuyó y la distribución de amplitudes de los potenciales miniatura no fueron afectados por la perfusión de ME y GABA. Por otro lado, esto también indica que la sensibilidad de los receptores de la neurona postsináptica no fue alterada (Glanzman y Thompson, 1980). Otro dato que descarta un efecto postsináptico es la posibilidad de producir recuperación espontánea durante el efecto inhibitorio de ME y GABA.

Uno de las hipótesis que también queríamos comprobar era si la habituación, que reduce la probabilidad de liberación de neurotransmisor, en una sinapsis sensible a la acción inhibitoria de los opioides, podía ser debida al reclutamiento del sistema encefalinérgico por la actividad misma de la sinapsis. Es decir, si en esta sinapsis, la producción de habituación podía depender de la activación del sistema opioide endógeno, como ha sido demostrado en la médula espinal (Fernández-Guardiola y col., 1989). Esta posibilidad fue descartada ya que la habituación profunda no fue revertida por la aplicación de naloxona.

Aunque no se detectaron cambios en la resistencia de entrada, no podemos descartar la posibilidad de un cambio de potencial de membrana en los sitios de liberación que pudiera dar cuenta de la disminución de la amplitud de los PPSE. Asimismo, no fue posible encontrar el potencial de inversión del PPSE aún a valores de potencial de membrana cercanos a cero. Ya que se trata de una sinapsis interganglionar, y los experimentos de inyección con amarillo de lucifer sugieren que el contacto sináptico se encuentra muy cercano a la

neurona presináptica, es difícil detectar cambios en el potencial de membrana de regiones tan alejadas del sitio de registro.

Con estos datos no nos es posible sacar conclusiones sobre el mecanismo iónico que subyace este efecto inhibitorio de la ME y del GABA. Sin embargo, nuestros experimentos sugieren fuertemente que ambos neurotransmisores inhibitorios en vertebrados, pueden modular a nivel de la sinapsis la liberación de neurotransmisor en este invertebrado. Uno de los puntos que nos limitan para extender conclusiones referentes a la interacción de estos neurotransmisores con el mecanismo de liberación en la sinapsis que describimos es que no conocemos la naturaleza del neurotransmisor que esta sinapsis utiliza, aunque hemos descartado la participación de algunos de ellos ya que la perfusión de antagonistas como haloperidol, MK-801, atropina y naloxona no bloquearon los PPSE ni modificaron la distribución de amplitudes.

Asimismo, es necesario realizar experimentos anatómicos que nos ayuden a determinar el sitio preciso del contacto sináptico, así como la determinación histoquímica de la presencia de receptores a estos neurotransmisores o la presencia de éstos mismos en la proximidad de esta sinapsis. En este sentido, Boer y col. (1986) han encontrado, en el caracol, granulos de secreción en terminales de axón inmunorreactivos a ME y la cantidad de sinapsis axo-axónicas que presentan gránulos con péptidos en las terminales presinápticas es muy abundante (Elekes y col., 1983).

Los resultados presentados en esta tesis ponen de relieve la importancia de contar con una preparación que permita el estudio de dos células identificadas, que están comunicadas sinápticamente, *in situ*. La preparación *in vitro* del ganglio neural (ganglios subesofágicos) del caracol *Helix aspersa* nos ha mostrado conformar una herramienta muy valiosa para el estudio de las acciones sinápticas de los péptidos opioides y, pese a la complejidad de la obtención de una preparación en condiciones idóneas para estos estudios de interacciones sinápticas, es un sistema anatómico relativamente sencillo y constante de individuo a individuo.

REFERENCIAS

- Boer, H. H., Geraerts, W. P. M., Schot, L. P. C. y Ebberink, R. H. M. Immunocytochemical and physiological studies on (neuroendocrine) neurons of the pond snail *Lymnaea stagnalis*, with particular reference to coexistence of biologically active peptides (BAP) and biogenic amines, to cardioactive peptides and to corelease of BAP from the ovulation hormone-producing caudodorsal cells. En: G. B. Stefano (Ed.), *Handbook of Comparative Opioid and Related Neuropeptide Mechanisms*, Vol. I, CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, 1986, pp. 223-241.
- Castellucci, V.F. y Kandel, E.R. A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71(12): 5004-5008, 1974.
- Comb, M., Seeburg, P.H., Adelman, J., Eiden, L y Hebert, E., Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*, 295: 663-666, 1982.
- del Castillo, J. y Katz, B. Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J. Physiol.* 125: 574-585, 1954.
- Duggan, A.W. North, R.A. Electrophysiology of opioids. *Pharm. Rev.* 35: 221-281, 1983.
- Dunlap, K. y Fischbach, G.D. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J. Physiol.* 317: 519-535, 1981.
- Edwards, F.A., Konnerth, A. y Sackman, B. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J. Physiol.* 439: 213-249, 1990.
- Elekes, K., Vehovszki, A. y Salánki, J. Ultrastructure of synaptic connections of a bimodal pacemaker giant neuron in the central nervous system of *Helix pomatia* L. *Neuroscience* 8: 617-629, 1983.
- Fernández-Guardiola, A., Calvo, J.M., Barragán, L.A., Alvarado, R. y Condés-Lara, M. Kindling in the spinal cord: differential effects on mono- and polysynaptic reflexes and its modifications by atropine and naloxone. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.*, 36(Suppl.): 257-263, 1982.

Fernández-Guardiola, A., Calvo, J.M. y Pellicer, F. Long-term synaptic potentiation and burst response increment could be due to enkephalinergic disinhibition. Experiments on the spinal cord and amygdaloid kindling. En: Kindling 3, (Ed. J. Wada), Raven Press, New York, pp. 157-172, 1986.

Fernández-Guardiola, A., Pellicer, F., Rocha, L. y Gutiérrez, R. Naloxone facilitates sensory precipitation of focal and generalized seizures. Evoked potentials and power spectral analysis in the cat. *Exp. Neurol.*, 101: 159-175, 1988.

Fernández-Guardiola, A., Pellicer, F., León-Olea, M., Asai, M. y Sánchez-Alvarez, M. Habituation and dehabituation of the spinal polysynaptic reflex responses: modification by naloxone and opiates and their anatomical correlates. *Neuropeptides* 14: 115-120, 1989.

Gingrich, K.J. y Byrne, J.H. Simulation of synaptic depression, posttetanic potentiation, and presynaptic facilitation of synaptic potentials from sensory neurons mediating gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 53: 652-669, 1985.

Glanzman, D.L. y Thompson, R.F. Alterations in spontaneous miniature potential activity during habituation of a vertebrate monosynaptic pathway. *Brain Res.* 189: 377-390, 1980.

Gomot, L. y Deray, A., Los caracoles. *La Recherche (Sp.Tr.)* 7: 478-489, 1987.

Gutiérrez, R. Efecto de la naloxona sobre neuronas identificadas de caracol *Helix aspersa*. Tesis de grado de maestría, U.N.A.M., 1988.

Gutiérrez, R. Effects of naloxone on membrane potential of identified neurons of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101C(2): 425-431, 1992.

Hackett, J.T., Cochran, S.L. y Greenfield, L.J.Jr. Quantal transmission at mauthner axon target synapses in the goldfish brainstem. *Neuroscience* 32(1): 49-64, 1989.

Hirai, K. y Katayama, Y. Methionine enkephalin presynaptically facilitates and inhibits bullfrog sympathetic ganglionic transmission. *Brain Res.* 448: 299-307, 1988.

Hughes, J., Smith, T.W., Kosteritz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. y Morris, H.R., Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258: 577-579, 1975.

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

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

Kandel, E.R. *Cellular Basis of Behavior*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Katz, B., y Miledi, R. A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J. Physiol.* 192: 407-436, 1967.

Klein, M., Shapiro, E. y Kandel, E.R. Synaptic plasticity and the modulation of the Ca^{2+} current. *J. exp. Biol.* 89: 117-157, 1980.

Konishi, S., Akinobu, T y Masnori, O. Enkephalin as a transmitter for presynaptic inhibition in sympathetic ganglia. *Nature*, 294: 80-82, 1981.

Kuno, M. Mechanisms of facilitation and depression of the excitatory synaptic potential in spinal motoneurons. *J. Physiol.* 175: 100-112, 1964.

Leung, M.K., Boer, H.H., van Minnen, J., Lundy, J., y Stefano, G.B., Evidence for an enkephalinergic system in the nervous system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res.*, 531: 66-71, 1990.

Lev-Tov, A. y Pinco, M. In vitro studies of prolonged synaptic depression in the neonatal rat spinal cord. *J. Physiol.* 447: 149-169, 1992.

Macdonald, R.L. y Nelson, P.G. Specific-opiate-induced depression of transmitter release from dorsal root ganglion cells in culture. *Science* 199: 1449-1451, 1978.

Macdonald, R.L. y Wertz, M.A. Dynorphin decreases voltage-dependent calcium conductance of mouse dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* 377: 237-249, 1986.

Martens, G. y Herbert, E. Polymorphism and absence of leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. *Nature*, 310: 251-254, 1984.

- Martin, A.R., y Pilar, G. Presynaptic and postsynaptic events during post-tetanic potentiation and facilitation in the avian ciliary ganglion. *J. Physiol.* 175: 17-30, 1964.
- Mudge, A.W., Leeman, F.E. y Fischbach, G.D. Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.* 76: 526-530, 1979.
- Nelson, P.G., Jia, M. y Neale, E.A. Regulation of calcium currents and synaptic transmitter release. En *Experimental Brain Research, Series 14*, pp. 196-206, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 1986.
- Noda, M., Furutanik, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S. y Numa, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*, 295: 202-206, 1982.
- North, R.A. y Williams, J.T. On the potassium conductance increased by opioids in rat locus coeruleus. *J. Physiol.* 364: 265-280, 1985.
- Rahaminoff, R. Modulation of transmitter release at the neuromuscular junction. En: *The Neurosciences: Third Study Program*, (Ed. F.O. Schmitt y F.G. Wordon), Cambridge, Mass., MIT Press, pp. 943-952, 1974.
- Smith, S.J. y Augustine, G.J. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends in Neurosci.* 11: 458-464, 1988.
- Smith, T.W., Hughes, J., Kosterlitz, H.W. y Sosa, R.P., Enkephalins: Isolation, distribution and function. En: *Opiates and Endogenous Opioid Peptides* (Ed. H.W. Kosterlitz), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 57-70, 1976.
- Stefano, G.B. y Leung, M.K., Opioid aging and seasonal variations in invertebrate ganglia: evidence for an opioid compensatory mechanism. En: *Handbook of Comparative Opioid and Related Neuropeptide Mechanisms* (Ed. G.B. Stefano), CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 199-210, 1986.
- Tremblay, J.P., Schlapfer, W.T., Woodson, P.B.J. y Barondes, S.H. Morphine and related compounds: evidence that they decrease available neurotransmitter in *Aplysia californica*. *Brain Res.*, 81: 107-118, 1974.
- Van der Kloot, W. The regulation of quantal size. *Progress in Neurobiol.* 36: 93-130, 1991.

Wernig, A. Changes in statistical parameters during facilitation at the crayfish neuromuscular junction. *J. Physiol.* 226: 751-759, 1972.

Yuan, X., Madamba, S. y Siggins, G.R. Opioid peptides reduce synaptic transmission in the nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.* 134: 223-228, 1992.

Zucker, R.S. Changes in the statistics of transmitter release during facilitation. *J. Physiol.* 229: 787-810, 1973.

Werz, M.A. y Macdonald, R.L. Opioid peptides selective for mu- and delta-opiate receptors reduce calcium-dependent action potential duration by increasing potassium conductance. *Neurosci. Lett.* 42: 173-178, 1983.