

201/189



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Liberación de IR-Met-Encefalina "in vitro"
en el Cuerpo Estriado de Ratas Tratadas
con Pentilenetetrazol'**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Manuel Zubieta Domínguez

México, D. F.

1984



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.

I N D I C E

I.	INTRODUCCION	1
	Aspectos Generales	1
	Liberación de Encefalinas	7
	Encefalinas y Epilepsia	11
II.	MATERIAL Y METODOS	16
III.	RESULTADOS	24
IV.	DISCUSION	33
V.	REFERENCIAS	37

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

Aspectos Generales.

El opio es uno de los narcóticos que ha sido utilizado desde los tiempos de la Grecia preclásica, ejerciendo en el hombre sus potentes acciones analgésicas y euforizantes.

Su aplicación médica llevó a que en el año de 1803 se aislara un alcaloide que constituía el principio activo del opio, denominándose a este compuesto morfina, el cual mostraba acciones farmacológicas, sobresaliendo de entre ellas su efecto para aliviar el dolor. Sin embargo, con el tiempo se observó que el uso constante de estos compuestos provocaba dependencia física o adicción. No fue sino hasta la segunda mitad del siglo actual cuando se empezaron a esclarecer las acciones fisiológicas del alcaloide. (Snyder 1981).

En un principio los investigadores se preguntaban por qué un compuesto extraído de una planta producía un efecto en el sistema nervioso animal. Se hicieron pruebas con morfina y formas análogas, en las cuales la configuración molecular era alterada, encontrándose efectos opuestos, iguales ó nulos a

los provocados por el alcaloide, lo que permitió establecer que una configuración específica era una condición esencial para ejercer su acción. (Rossier 1982)

En 1971 Goldstein y col. proponen que los narcóticos opiáceos tienen un extraordinario grado de estereoespecificidad. Mientras los compuestos levorrotatorios son farmacológicamente activos, los isómeros dextrorrotatorios no son ni agonistas, ni antagonistas, son totalmente inactivos, por lo tanto, estos resultados indicaban la presencia de un receptor estereoespecífico.

En 1973 Pert y Snyder demostraron en membranas neuronales, receptores capaces de unirse a compuestos opiáceos con un alto grado de especificidad.

A la fecha se han descrito tres sistemas de opioides endógenos, en el sistema nervioso central.

El primero derivó de las investigaciones de Hughes en 1974, quién purificó una sustancia de homogenados de cerebro de cerdo, la cual presentaba una actividad inhibitoria igual que la morfina, en los ensayos biológicos sobre la vasa deferente del ratón y el plexo mientérico del cobayo, a los que se les inducían contracciones. Estos efectos fueron bloqueados por drogas antagonistas de la morfina, como naloxona, naltrexona y el Mr-1302. A la vez este autor comentó que esta sustancia se

comportaba como un péptido de cadena corta de aproximadamente 700 de peso molecular.

Hughes y col. posteriormente, (1975) determinaron que la sustancia agonista de la actividad opióide, eran dos penta-péptidos cuyas secuencias son:

tir - gli - gli - fen - Met (Metionina encefalina)

tir - gli - gli - fen - Leu (Leucina encefalina)

que varían sólo en el aminoácido del carboxilo terminal. Estos autores nombraron a los dos péptidos encefalinas.

Al poco tiempo del descubrimiento de las encefalinas, se describió el segundo sistema opióide. Bradbury y col. (1976) encontraron un compuesto en la hipófisis del porcino, que también presenta actividad opióide, haciendo notar que esta molécula corresponde al fragmento 61-91 de la β - lipotrofina (Li 1964) y la nombraron β - endorfina. Ling y col. (1976) determinaron las estructuras de la alfa y gamma enforfina, aisladas del extracto hipotálamo-hipófisis del porcino, las cuales también mimetizan la acción de la morfina. Estas moléculas corresponden a los fragmentos 61-76 y 61-77 de la B - lipotrofina (β - LPH), respectivamente.

En 1979 Kanagawa y Matsuo describieron otro compuesto opióide, un péptido aislado del hipotálamo del cerdo, al cual denominaron α - neo - endorfina. Al poco tiempo Goldstein y

col. (1979) reportaron una molécula más con actividad morfomimética, extraída de la pituitaria del cerdo, nombrándola dinorfina. Estos péptidos, constituyen el tercer sistema opioides.

De los compuestos opioides, las encefalinas son las que presentan la más amplia distribución dentro del sistema nervioso central. Estos neuropéptidos se encuentran en el cerebro de todos los vertebrados (Hughes y col. 1977, Yang y col. 1977 y Miller y col. 1978), y su distribución regional es paralela a la de los receptores opiáceos (Kuhar y col. 1973). Las concentraciones más altas se encuentran a nivel de los ganglios basales y el sistema límbico; concentraciones intermedias en el tálamo, cerebro medio y médula espinal; y bajas concentraciones en el hipocampo, corteza cerebral y cerebelo (Hughes y col. 1977. Yang y col. 1977 y Miller y col. 1978). A nivel periférico se encuentran en altas concentraciones en la médula adrenal, almacenándose junto con las catecolaminas (Viveros y col. 1980).

En lo que respecta a las alfa, beta y gamma endorfinas, éstas se encuentran principalmente en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis, materia gris periacueductal y en el sistema límbico (Blomm y col. 1977, Fratta y col. 1979).

La α -neo - endorfina, se encuentra en altas concentraciones en el cuerpo estriado; disminuyendo su cantidad en el

cerebro medio, hipocampo e hipotálamo; y en bajas concentraciones en médula, cerebelo, corteza cerebral y pituitaria. (Giraud y col. 1983).

La dinorfina presenta sus mayores niveles en médula y bulbo raquídeo, niveles medios en el hipotálamo; y niveles bajos en cerebro medio, cerebelo, corteza, cuerpo estriado e hipocampo. (Giraud y col. 1983).

Actualmente se conocen los precursores de los tres sistemas opioides hasta ahora descritos.

En el caso de las encefalinas, Noda y col. (1982) y Gubler y col. (1982) caracterizaron un precursor protéico, aislado de la médula adrenal de bovino, que está constituido por 263 aminoácidos y cuyo peso molecular es de 30 000 daltons.

A esta molécula se le dio el nombre de proencefalina A y contiene 4 copias de met-encefalina y una copia de leu-encefalina. Además este precursor incluye otras dos secuencias que tienen actividad opioide. Estas son un heptapéptido (tir - gli - gli - fen - met - arg - fen) y un octapéptido (tir - gli - gli - fen - met - arg - gli - leu), las cuales presentan la secuencia de la met-encefalina en la porción aminoterminal.

Como se mencionó anteriormente, el sistema opioide que está constituido por las tres endorfinas deriva de la β - LPH,

sin embargo, Mains y col. en 1977 demostraron que la β - LPH estaba formando parte de una larga molécula precursora, que contiene además otros compuestos activos, como la hormona melanotrópica (MSH) y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Debido a estos hallazgos, a este precursor se le denominó pro-opio-melanocortina.

En lo que se refiere a la biogénesis del tercer sistema opioide (α - neo - endorfina y dinorfina), Kakidani y col. (1982) han descrito el precursor, llamándolo proencefalina B o prodinorfina, el cual presenta además otros compuestos con actividad opioide como la β - neo - endorfina (Minamino y col. 1981) y la rimorfina (Kilpatrick y col. 1982).

Liberación de Encefalinas.

Para que una sustancia pueda ser catalogada como un supuesto neurotransmisor, debe cumplir al menos ciertos criterios: Que dicho compuesto sea sintetizado en la neurona; que se encuentre localizado en la región sinaptosomal; que se libere de la terminal sináptica; que tenga acción sobre un receptor a nivel postsináptico y que sea degradado o removido para suprimir su efecto (Schwartz 1981). Las encefalinas cumplen con el conjunto de estas características.

Como se mencionó anteriormente, las encefalinas se sintetizan en la neurona partiendo de precursores que se generan a nivel ribosomal y cuentan con receptores estereoespecíficos.

La distribución subcelular de las encefalinas ha sido estudiada por varios autores (Simantov y col. 1976, Osborne y col. 1978a), encontrándose que estos péptidos se localizan principalmente en la fracción sinaptosomal.

Por otro lado, se ha reportado la liberación " in vitro " de las encefalinas endógenas de rebanadas de tejido cerebral y de sinaptosomas. Estas rebanadas cerebrales son una preparación, donde la organización morfológica es preservada. También se ha visto la liberación " in vivo " de estos neuropéptidos con la introducción de un sistema de canulación en áreas específicas del cerebro. En estos estudios se ha indu-

cido la liberación con agentes despolarizantes como potasio y veratridina.

Henderson y col. (1978) con rebanadas del cuerpo estriado y con sinaptosomas de conejos y cobayos, reportaron la liberación de met - y leu - encefalina. Iversen y col. (1978) y Bayón y col. (1978) describieron la liberación " in vitro " de encefalinas del globus pallidus de la rata. En otros trabajos, diversos autores (Osborne y col. 1978b, Ritcher y col. 1979, Sawynok y col. 1980, Osborne y col. 1980, Linderberg y col. 1981) han analizado la liberación " in vitro " de ambas encefalinas en el cuerpo estriado de la rata. Con el sistema de canulación " in vivo ", se han encontrado resultados similares en el globus pallidus del gato (Cesselin y col. 1981) y en la misma estructura cerebral de la rata (Bayón y col. 1981).

Todos estos trabajos han mostrado que la liberación de encefalinas es un proceso dependiente de calcio. Por lo tanto se asume que estos neuropéptidos se comportan claramente como otros neurotransmisores del sistema nervioso central.

Los datos que se tienen sobre la regulación de la liberación de encefalinas, son de los trabajos de Osborne y col. (1980), quien encontró que el único compuesto que regula inhibitoriamente la liberación " in vitro " de Met - encefalina en el cuerpo estriado de la rata, es el ácido gamma amino

butírico (GABA), no observando efectos de otros neurotransmisores y drogas. Por otra parte, Bourgoïn y col. (1982) en experimentos " in vivo " en el globus pallidus del gato, reportaron el mismo efecto inhibitorio con el GABA y una respuesta opuesta con su antagonista la bicuculina. En base a esto, los autores sugieren que este efecto es mediado por los receptores gabaérgicos.

En lo referente al catabolismo de las encefalinas, se han señalado a varias peptidasas que tienen un papel degradativo, sobre estos neuropéptidos en el sistema nervioso central.

Los estudios iniciales señalaron que la principal vía de degradación en el cerebro, era por la remoción de la tirosina N-terminal por una aminopeptidasa (Hambrock y col. 1976). Otros hallazgos demostraron que en realidad se trata de dos aminopeptidasas, una localizada en la fracción soluble y otra unida a membrana (Hersh 1982).

Estudios posteriores mostraron la existencia de una dipeptidil carboxipeptidasa (encefalinasa), presente en la fracción de membrana, la cual rompe a la molécula de encefalina en la posición $\text{gly}^3 - \text{phen}^4$ (Malfroy y col. 1978). La distribución de esta enzima, es paralela a la de las encefalinas y receptores opiáceos; lo cual sugiere que es específica y está localizada selectivamente en las sinapsis encefalinérgicas (Malfroy y col. 1979). En el cerebro también se localiza

otra enzima, llamada enzima convertidora de angiotensina (ACE), (Yang y Neff 1980), que si bien rompe al mismo nivel que la encefalinasa a los pentapéptidos (Erdos y col 1978), su distribución regional no está relacionada con las encefalinas, por lo que se ha pensado que no tiene un papel degradativo específico (Swertz y col. 1979). Por último, Goronstein y Snyder en 1979. obtuvieron una dipeptidil aminopeptidasa que da como resultado una ruptura de las encefalinas entre la unión $\text{gli}^2\text{-gli}^3$, dándole el nombre de encefalinasa B. Sin embargo, estudios de estos mismos autores mostraron que la mayor actividad de esta enzima, está en la fracción soluble, por lo que ellos concluyen que no es claro el papel de esta peptidasa en la degradación de encefalinas.

Existen varias sustancias que inactivan a las enzimas que actúan sobre las encefalinas.

Para las aminopeptidasas, se ha descrito a la puromicina como un inhibidor selectivo (Patey y col. 1981) y otros potentes inhibidores como la bestatina (Barclay y col. 1978) y la bacitracina (Traficante y col. 1980). La encefalinasa resulta ser inactivada selectivamente por el tiorfan y el dipéptido fen-ala (Patey y col. 1981), y en menor grado por la bacitracina (Benuck y Marks 1980). En el caso de la enzima ACE, se ha demostrado que el captotril es un potente inhibidor de ésta. (Patey y col. 1981). Finalmente, hasta la fecha no se ha reportado inhibidores que tengan una acción significativa sobre la encefalinasa B.

Encefalinas y Epilepsia.

A partir del descubrimiento de las encefalinas en 1975, varios grupos de investigadores han desarrollado una intensa actividad para dilucidar cuál es la participación de estos péptidos opioides en el sistema nervioso central, particularmente en relación a problemas clínicos tales como la analgesia, mecanismos narcóticos y epilepsia.

La epilepsia es una patología crónica producida por las crisis cerebrales resultantes de la descarga hipersincrónica de un grupo de neuronas (Gastaut 1977).

Varios estudios farmacológicos y bioquímicos han mostrado que las encefalinas pueden participar en los procesos epilépticos.

Urca y col. (1977) y Frenk y col. (1978a) encontraron que la inyección intracerebro ventricular en la rata de la leu-encefalina y la met-encefalina producen alteraciones epiléptiformes en el electroencefalograma, acompañadas con alteraciones conductuales como mioclonias (contracciones musculares) y sacudidas musculares (como de " perro mojado "). Estos efectos fueron bloqueados por la previa administración sistémica del antagonista naloxona. Los mismos cambios fueron a su vez observados con microinyecciones de met-o leu-encefalina en el hipocampo (Sprick y col. 1981), núcleo dorso medial del

tálamo (Frenk y col. 1978b), cerebro anterior y núcleo caudado (Neal y Keane 1978). Frenk y col. (1978b) indicaron que existen diferencias en la especificidad de respuesta a la inyección de encefalinas, ya que la aplicación de estos péptidos en la sustancia gris periacueductal producen analgesia y no epilepsia.

Por otro lado, los estudios de Snead y Bearden (1980) mostraron que el efecto epiléptico de la leu-encefalina puede antagonizarse con el tratamiento de anticonvulsivantes para pequeño mal, siendo inefectivos los de gran mal.

Con el uso de la morfina, se ha encontrado que ésta modifica las crisis generalizadas inducidas por varios modelos experimentales de epilepsia, tales como el tratamiento con drogas convulsivantes como el fluorotyl y el pentilenetetrazol (PTZ) (Adler y col. 1976), estimulaciones eléctricas repetidas en la amígdala del lóbulo temporal (Kindling Eléctrico Amigdalino) (Frenk y col. 1979, Le Galle La Salle 1977) y aplicaciones de electrochoques convulsivos (Tortella y col. 1981).

Algunos autores han descrito a la morfina como un agente epileptogénico. Mammino y Wolf (1974) demostraron que este opiáceo disminuye el umbral convulsivo para el PTZ en el ratón. Por otra parte, Mc Guigan y Ross (1915) observaron que la aplicación de morfina potencia el efecto convulsivo de la estriconina en la rana. Sin embargo, otros autores han encontra-

do efectos antiepilépticos con la morfina. Frenk y col. (1979) observaron que el opiáceo prolonga la depresión post-ictal* de las crisis generalizadas inducidas por el Kindling eléctrico amigdalino. Caldecott y col. (1982) reportaron que la inyección de morfina da como resultado una disminución en la severidad del comportamiento convulsivo producido por el mismo modelo experimental de epilepsia. Recientemente Urca y Frenk (1980) han sugerido que este agonista opiáceo puede actuar como un antiepiléptico antes de una crisis y como proepiléptico después de ésta. Ellos encontraron que el pretratamiento con morfina por vía sistémica retarda la aparición de las crisis inducidas por el PTZ, sin embargo, este efecto anti convulsivante es seguido por un aumento de crisis repetidas en los mismos animales experimentales.

Por otro lado, varios modelos experimentales de epilepsia modifican el contenido de encefalinas en el cerebro de la rata.

Hong y col. (1979, 1980) encontraron un incremento de Met-encefalina después de varios electrochoques convulsivos y con el tratamiento de fármacos convulsivantes como el ácido kaínico y la isoniazida. Con el Kindling eléctrico amigdalino, Vindrola y col. (1981) reportaron un aumento en los niveles de ambas encefalinas 24 horas después de crisis generalizadas repetidas. Estos efectos también se presentan en varias estructuras cerebrales, de ratas sometidas al Kindling farmacológico

* Post-ictal: Silencio electroencefalográfico posterior a una crisis.

lógico inducido por el tratamiento crónico con PTZ. (Vindrola y col. 1983).

En trabajos recientes Vindrola y col. (1984) mostraron que los niveles de la Met-encefalina, posteriores a las crisis repetidas inducidas por el Kindling con PTZ, se mantienen permanentemente altos. No así para los niveles de la leu-encefalina.

Frenk y col. (1979) utilizando el Kindling amigdalino y Tortella y col. (1981) con electrochoques convulsivos han reportado que la morfina prolonga la depresión post-ictal y la naloxona la reduce. En base a lo anterior, estos autores sugieren que los péptidos opioides pueden liberarse durante la etapa ictal* de una crisis convulsiva para producir la depresión post-ictal.

En otros estudios Hong y col. (1981) han encontrado que la inyección local de ácido kaínico en el hipocampo, produce después de 6 horas una baja en los niveles de met-encefalina. Ellos sugieren que este efecto se puede deber a un aumento en la utilización del péptido. Vindrola y col. (1984) obtuvieron resultados semejantes, cuando observaron una disminución de la leu- y met-encefalina en varias regiones del cerebro de la rata, una hora después de las convulsiones provocadas por el Kindling con PTZ.

* Ictal: Patrón electroencefalográfico que caracteriza una crisis convulsiva.

El presente trabajo se plantea el objetivo de esclarecer si las encefalinas pueden liberarse durante una crisis convulsiva. Para esto, se decidió estudiar la liberación " in vitro " de la Met-encefalina, en las rebanadas del cuerpo estriado de las ratas sacrificadas durante la extensión tónica*, de las crisis tónico-clónicas** generalizadas, inducidas por el Pentilenetetrazol (PTZ).

Asimismo, se analizó el efecto de la perfusión " in vitro " del ácido gamma amino butírico (GABA) sobre la liberación de Met-encefalina. Este aminoácido actúa como un neurotransmisor inhibitorio en las crisis epilépticas (Tapia 1975) y disminuye la liberación de encefalinas " in vivo " en el globus pallidus e " in vitro " en el cuerpo estriado.

* Extensión tónica: Contracción muscular sostenida.

** Tónico-clónica: Componentes de una crisis convulsiva. Tónico.- Contracción muscular sostenida. Clónica.- Sucesión de contracción y relajación muscular.

II MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas machos Long Evans con un peso promedio de 200-250 g. Estas se mantuvieron en un cuarto con temperatura y luz controladas ($23 \pm 1^\circ \text{C}$ y con 12 hrs. de iluminación comenzando el ciclo a las 6:00 a.m.).

Diseccción del cuerpo estriado y método general de perfusión.

Las ratas se sacrificaron por decapitación entre las 10 y 12 hrs. a.m., se removieron los cerebros, los que se incubaron durante dos minutos en 15 ml de una solución Krebs-Bicarbonato (Na Cl: 118 mM, KCl: 4.8 mM, CaCl_2 : 2.5 mM, $\text{KH}_2 \text{PO}_4$: 1.2 mM, Mg SO_4 : 1.2 mM, Na HCO_3 : 25 mM y Glucosa 10 mM), pH 7.4, a 4°C . El cuerpo estriado de cada cerebro se disecó siguiendo el método de Glowinsky e Iversen (1966) se pesó en una balanza analítica (Mettler) y se mantuvo durante 15 minutos en 15 ml de solución Krebs-Bicarbonato, a 4°C . Los cuerpos estriados de tres ratas se colocaron en un rebanador tipo Mc Ilwain (Brikman), donde se les practicaron cortes de 300μ en dos direcciones perpendiculares. Las rebanadas resultantes se incubaron durante 15 minutos en 25 ml de Krebs-Bicarbonato saturado con una mezcla de 95% O_2 y 5% CO_2 , a 37°C . Estas se transfirieron a una cámara de perfusión de plástico, donde fueron perfundidas con medio Krebs-Bicarbonato saturado con

95% O₂ y 5% CO₂, a 37° C, a una velocidad de flujo de 1 ml/minuto, regulada por una bomba polistáltica (Buchler). Después de un período de lavado de 15 minutos, las rebanadas se perfundieron durante 20 minutos adicionales, antes de aplicarles el estímulo despolarizante con una alta concentración de potasio. Para mantener la isotonicidad en el medio Krebs-Bi carbonato con alto K⁺, el exceso de iones cloro se compensó disminuyendo la molaridad del cloruro de sodio.

Se utilizaron en cada experimento cuatro cámaras de perfusión, las cuales se perfundieron simultáneamente.

En la figura 1 se esquematiza el diseño experimental.

Efecto de inhibidores enzimáticos sobre la liberación " in vitro " de Met - encefalina.

En este estudio se trabajó con rebanadas de cuerpo estriado de ratas que no recibieron ningún tratamiento. Se probaron dos compuestos que inhiben la degradación de la Met-encefalina: Bacitracina (30 ug/ml) y fenilalanina-alanina (1 mM), los cuales se agregaron al medio de perfusión 10 minutos antes y durante el estímulo despolarizante. Con ambas sustancias se cuantificó la liberación basal de met-encefalina y la inducida con 50 mM de K⁺ durante 5 minutos. Se recolectaron las muestras de perfusión cada 5 minutos en tubos de ensayo siliconizados, que contenían 0.5 ml de HCl 1N. Estas se

incubaron a 92° C durante 15 minutos, se enfriaron en hielo y fueron almacenadas a -20° C. Por otro lado, al finalizar la perfusión, las rebanadas de cada cámara, se transfirieron a un tubo de ensayo siliconizado con 4 ml de HCl 0.1 N y se procesaron al igual que las muestras de perfusión.

Liberación " in vitro " de Met-encefalina en el cuerpo estriado de animales tratados con PTZ. Efecto del ácido gamma amino butírico (GABA).

En estos experimentos se cuantificó la liberación de met-encefalina en rebanadas del cuerpo estriado, de dos grupos de animales: Ratas inyectadas por vía i.p. con 100 mg/kg de PTZ, las cuales presentaron crisis tónica-clónicas generalizadas y se sacrificaron durante la extensión tónica, y ratas inyectadas con un volúmen equivalente al del grupo anterior, con solución salina (Controles).

Los estudios se realizaron aplicando un estímulo despolarizante de 22 mM de K⁺ durante 10 minutos, utilizando el dipéptido fen-ala como inhibidor enzimático. Las muestras de perfusión se colectaron cada 10 minutos en tubos de ensayo siliconizados con 1 ml de HCl 1N. Al término de las perfusiones las rebanadas se transfirieron a un tubo de ensayo siliconizado con 4 ml de HCl. Ambos tipos de muestras se incubaron a 92° C durante 15 minutos, se enfriaron en hielo y se almacenaron a

- 20° C.

Para analizar el efecto del GABA, se trabajó bajo las condiciones experimentales antes mencionadas, perfundiendo el aminoácido 20 minutos antes del estímulo despolarizante, a una concentración de 100 μ M.

Por otro lado se cuantificó la liberación de la encefalina en ausencia de calcio, en rebanadas del estriado de animales controles. Para esto se suprimió del medio de perfusión al cloruro de calcio.

Finalmente en un estudio paralelo, se cuantificó la met-enkefalina en el cuerpo estriado sin rebanar de animales tratados con solución salina y PTZ.

Purificación de Metionina - Encefalina.

Los tejidos fueron homogenizados (Homogenizador Thomas) y centrifugados a 50 000 x g, por 45 minutos a 4° C (Centrifuga Beckman J-21C). Los sobrenadantes resultantes y las muestras de perfusión se purificaron por cromatografía de adsorción, en columnas de Amberlita XAD-2 (8 x 0.7 cm.) a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Las muestras se aplicaron en las columnas, se lavaron con 20 ml de HCl 0.1N seguidas de 40 ml de agua bidestilada y finalmente se eluyeron con 20 ml de

metanol absoluto. El metanol se evaporó con aire a sequedad en baño María y las muestras se resuspendieron en 1 o 2 ml de agua bidestilada, dependiendo si estas eran de perfusión o de tejido respectivamente.

Cuantificación de Met-Encefalina por radioinmunoanálisis
(RIA).

Alicuotas de 0.1 ml de las muestras de tejido y 0.5 ml de las de perfusión se oxidaron con 1 umol de peróxido de hidrógeno, durante 24 hrs. a temperatura ambiente. Se evaporaron a sequedad con aire y se resuspendieron en 1 y 0.5 de agua bidestilada respectivamente.

El antisuero utilizado en este ensayo fue obtenido previamente en el laboratorio (Vindrola y col. 1981), presentando las siguientes características: 100% de reactividad cruzada con Met-encefalina oxidada (sulfóxido), 0.3% con leu-encefalina y menos de 0.01% con met-encefalina-Arg⁶, leu-encefalina-Arg⁶, alfa, gamma y beta-endorfina. (Ver Figura 2)

El antisuero (dilución - Anti - encefalina 1:2100) se incubó con 5 000 cpm de [³H] - Met-encefalina (New England Nuclear), y soluciones estándares o muestras experimentales, en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4 (con 0.1% de gelatina, 0.02% de azida de sodio y 0.9% de Na Cl), con un volúmen total de

0.6 ml. Después de una incubación de 24 horas a 4° C, la ³H-met-encefalina unida al anticuerpo fue separada de la ³H-met-encefalina libre por precipitación con carbón activado (suspensión en buffer al 1.5%, mezclado con 0.1% de dextran). A cada una de las muestras, se les agregó 200 ul del carbón activado y se centrifugaron a 4 000 rpm durante 20 minutos, a 4° C (Centrifuga Beckman J-21C). Los sobrenadantes se pasaron a viales de vidrio, se les agregó líquido de conteo (tolueno, tritón X-100 y PPO) y se contaron en un aparato de centelleo líquido (Mod. LS-7500 Beckman). Cada una de las muestras se trabajaron por triplicado y se expresan en ng/g de tejido, como la inmuno-reactividad de Metionina-encefalina (IR-Met-Encefalina).

Para la comparación estadística de los resultados se empleó el ensayo de la " t " de Student.

DESCRIPCION DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

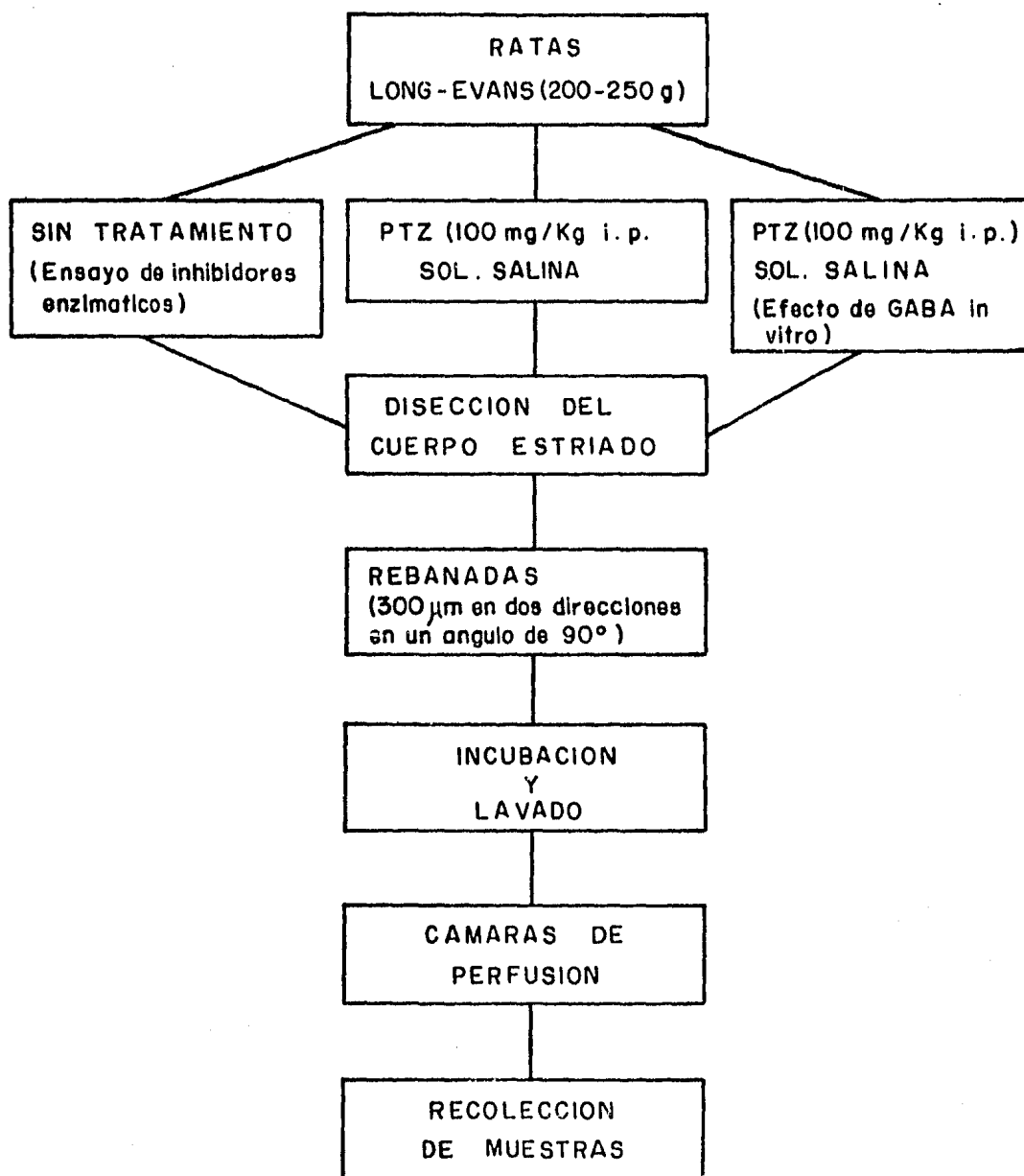


FIGURA 1.- Descripción del diseño experimental.

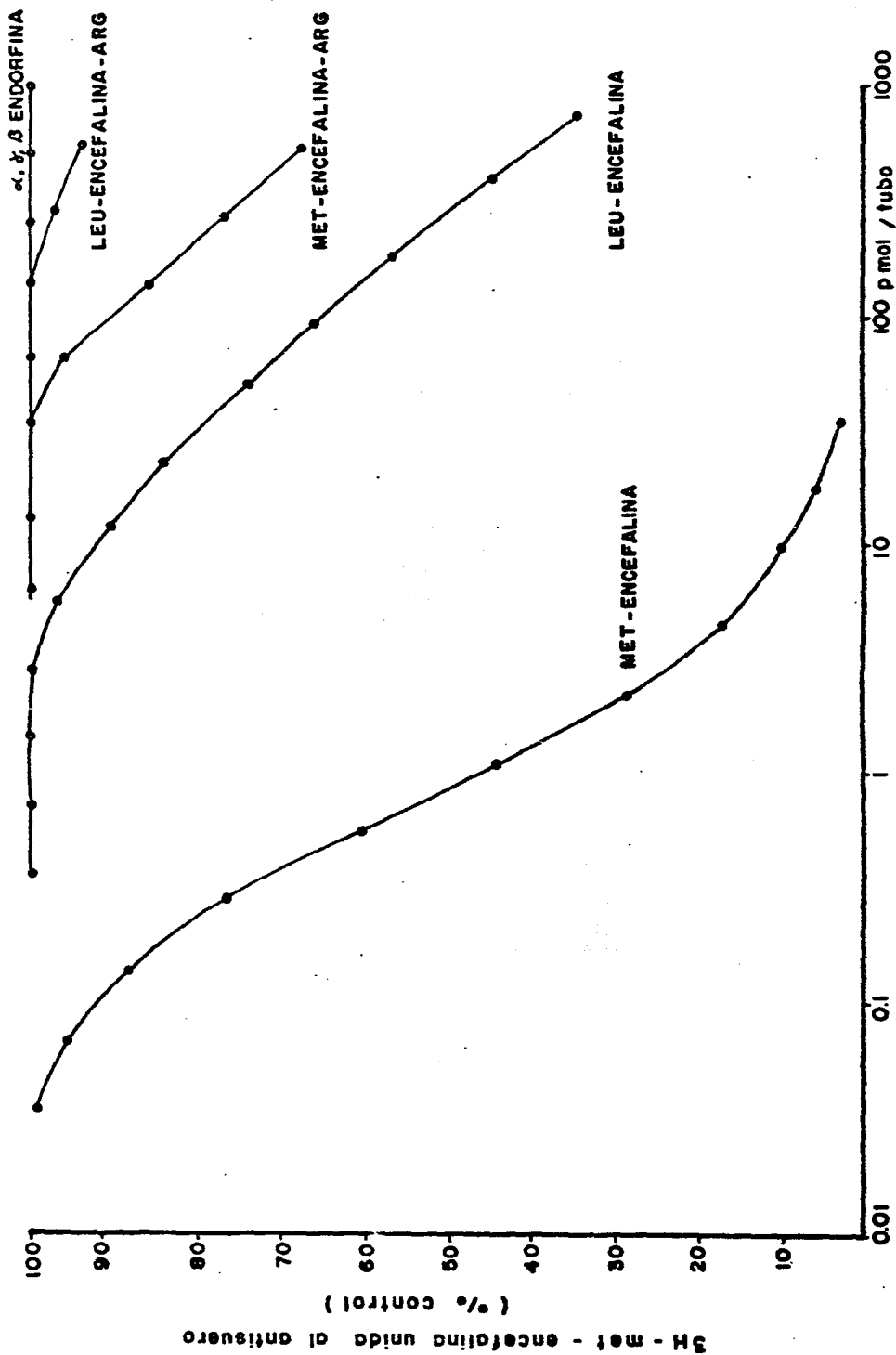


FIGURA 2.- Anticuerpo de Met-enkefalina, a una dilución de 1:2100. La reactividad cruzada con Leu-enkefalina es de 0.3% y menor de 0.01% con Met-enkefalina-Arg⁶, Leu-enkefalina-Arg⁶, alfa, gamma y beta endorfina.

III R E S U L T A D O S

Efecto de inhibidores enzimáticos sobre la liberación " in vitro " de IR - Met - encefalina.

En estos estudios se decidió utilizar 50 mM de potasio, ya que con esta concentración se obtiene una liberación máxima de la met-encefalina (Osborne 1980), y por lo tanto se puede observar qué inhibidor enzimático es más eficiente para evitar la degradación de la encefalina.

En la Figura 3 se observa que la aplicación de un estímulo despolarizante, con 50 mM de K^+ durante 5 minutos en ausencia de inhibidores enzimáticos, produjo un aumento de 6-8 veces en la liberación de la IR-Met-encefalina.

La bacitracina y la fenilalanina-alanina, al ser utilizadas como inhibidores enzimáticos, no modificaron la liberación basal del pentapéptido; sin embargo, incrementaron su recuperación cuando se aplicó el estímulo despolarizante (bacitracina 12-14 veces, fen-ala 35-45 veces). (Figura 3)

La concentración de IR-Met-encefalina residual en las ranadas de cuerpo estriado, después del proceso de perfusión, fué semejante en los experimentos realizados con inhibidores enzimáticos y sin ellos. (Sin inhibidor: 358 ± 13 ng/g;

Bacitracina: 299 ± 21 ng/g; Fen-ala: 362 ± 27 ng/g. Media \pm error estandar, número de experimentos = 8).

Liberación " in vitro " de IR - Met - encefalina en el cuerpo estriado de animales tratados con PTZ. Efecto de GABA.

En esta serie de estudios se utilizó una concentración de 22 mM de K^+ como estímulo despolarizante. Esto se debió a que diversos autores (Arbilla y col. 1979. Osborne y col. 1980) han demostrado que la condición óptima para analizar el efecto de drogas sobre la liberación de neurotransmisores putativos, es aquella en la que se utiliza una baja concentración del ión. Además con 22 mM de K^+ se produce un aumento en la liberación de met-encefalina, que es coincidente con la sensibilidad del método de cuantificación.

En base a los resultados del experimento anterior, se utilizó fen-ala como inhibidor enzimático, ya que protege más efectivamente el catabolismo del pentapéptido.

En la Figura 4 se observa que 22 mM de K^+ produce un aumento de 3-4 veces en la liberación de la IR-Met-encefalina. Este efecto fué completamente bloqueado cuando se eliminó el ión calcio del medio de perfusión.

En las rebanadas de animales tratados con PTZ, la liberación basal fué semejante a la de los controles, sin embargo, se

observó un aumento estadísticamente significativo (64%) cuando se estimuló por 10 minutos con 22 mM de K^+ . (Figura 4)

En la tabla 1 se observa que los niveles de IR-Met-encefalina aumentaron significativamente tanto en las rebanadas como en el estriado completo de animales tratados con PTZ (46% y 36% respectivamente).

Varios autores (Osborne y col. 1980, Bourgoïn y col. 1982) han reportado que el GABA inhibe la liberación de Met-encefalina " in vitro " e " in vivo ", en el cuerpo estriado de la rata y en el globus pallidus del gato, respectivamente.

En la Figura 5 se muestra que el GABA (100 μ M) perfundido 20 minutos antes del estímulo despolarizante, redujo significativamente (62.5%) la liberación de la IR-Met-encefalina en las rebanadas del cuerpo estriado de animales controles (Controles + GABA). Este mismo efecto se observó en las rebanadas de tejido de animales tratados con PTZ (PTZ + GABA) (65 %), aunque, los valores obtenidos fueron significativamente más altos que los observados en los controles (Controles + GABA).

La perfusión con GABA no modificó los niveles en las rebanadas del cuerpo estriado de animales controles, sin embargo, el aumento observado en las rebanadas del estriado de animales tratados con PTZ se redujo a valores controles. (Tabla 1).

FIGURA 3.- Efecto de los inhibidores enzimáticos sobre la liberación de IR-Met-encefalina de las rebanadas del cuerpo estriado, expuestas a 50 mM de K^+ por 5 minutos. a) Sin inhibidor, b) 30 μ g/ml de Bacitracina y c) 1 mM de fen-ala. Las muestras de perfusión se colectaron cada 5 minutos. Los valores se expresan en ng/g de tejido y representan la media \pm error estandar. Número de experimentos = 8.

FIGURA 4.- Liberación de IR-Met-encefalina de las rebanadas del cuerpo estriado, inducida por 22 mM de K^+ por 10 minutos y con 1 mM de fen-ala como inhibidor enzimático. a) Control, b) Control en ausencia de Ca^{++} y c) Ratas tratadas con PTZ, sacrificadas durante la extensión tónica. Las muestras de perfusión se colectaron cada 10 minutos. Los valores se expresan en ng/g de tejido y representan la media \pm error estandar. Número de experimentos = 8.

(*) Prueba de "t" de Student, $p < 0.01$ comparado con el valor control.

FIGURA 5.- Efecto de la perfusión " in vitro " con GABA sobre la liberación de IR-Met-enkefalina las rebanadas del cuerpo estriado, inducida por 22 mM de K^+ por 10 minutos y con 1 mM de fen-ala como inhibidor enzimático. El aminoácido fué agregado 20 minutos antes del estímulo con K^+ . a) GABA en grupos controles y b) GABA en grupos tratados con PTZ. Las muestras de perfusión se colectaron cada 10 minutos. Los valores se expresan en ng/g de tejido y representan la media \pm error estandar. (Número de experimentos)

(*) (●) (+) Prueba de "t" de Student.

(*) $p < 0.001$ comparado con el grupo control.

(●) $p < 0.001$ comparado con el grupo PTZ.

(+) $p < 0.01$ comparado con el valor del grupo control + GABA.

FIGURA 3.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES ENZIMATICOS SOBRE LA LIBERACION DE IR - MET - ENCEFALINA

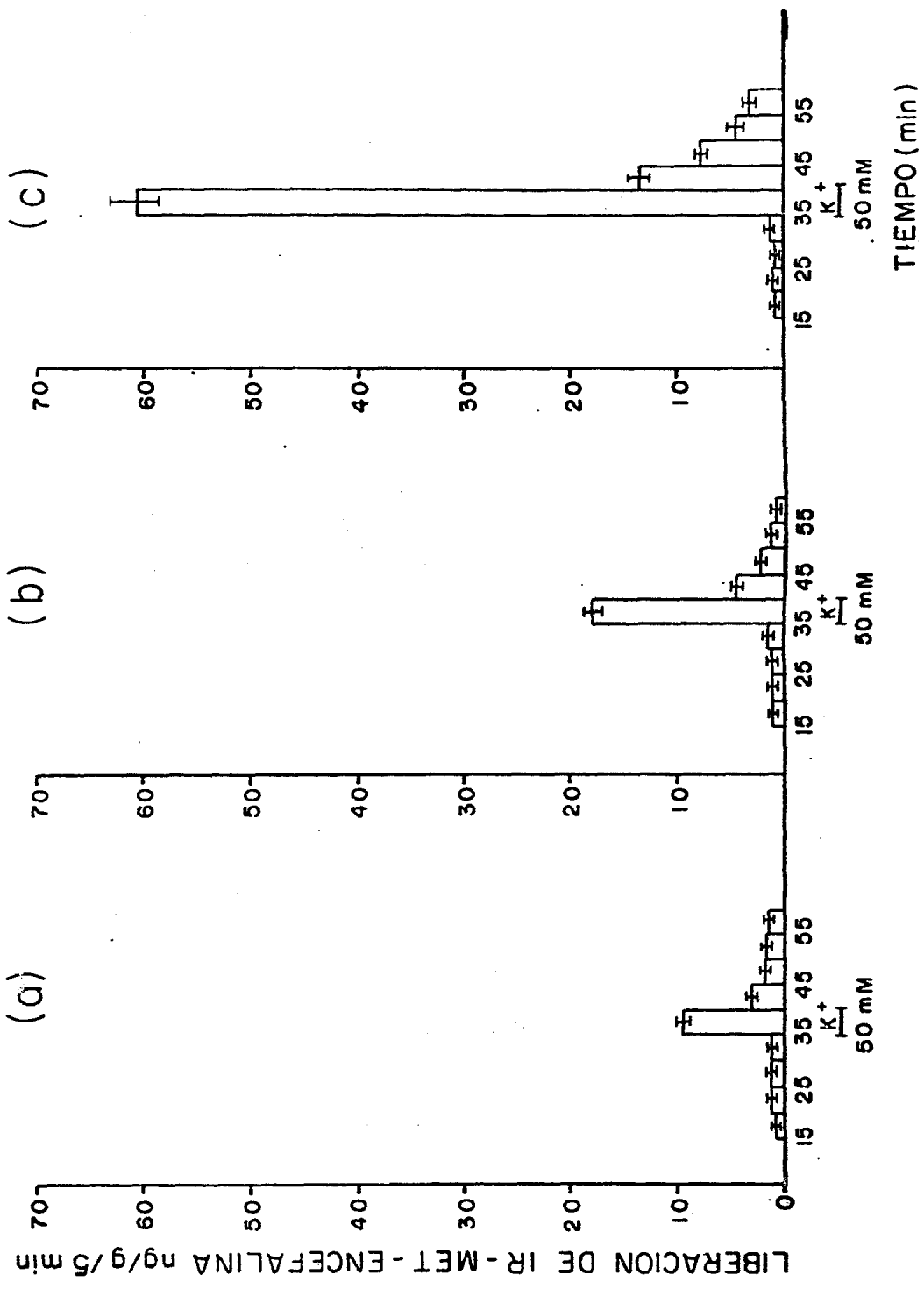


FIGURA 4.- LIBERACION DE IR-MET-ENCEFALINA DE LAS REBANADAS DE LAS REBANADAS DEL CUERPO ESTRIADO DE RATAS TRATADAS CON PTZ.

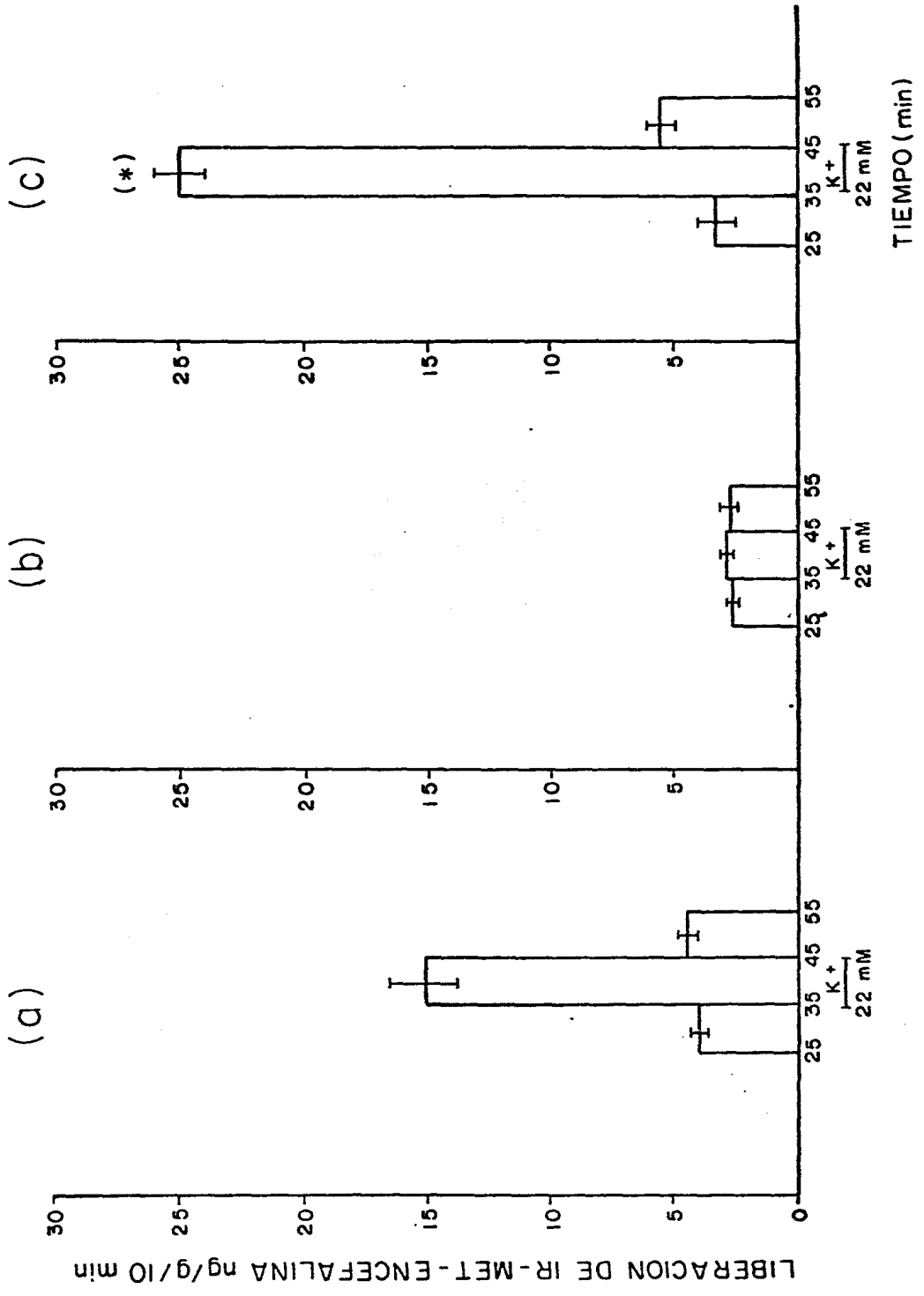


FIGURA 5.- EFECTO DE LA PERFUSION " IN VITRO " DE GABA SOBRE LA LIBERACION DE IR - MET - ENCEFALINA DE LAS REBANADAS DEL CUERPO ESTRIADO DE RATAS TRATADAS CON PTZ.

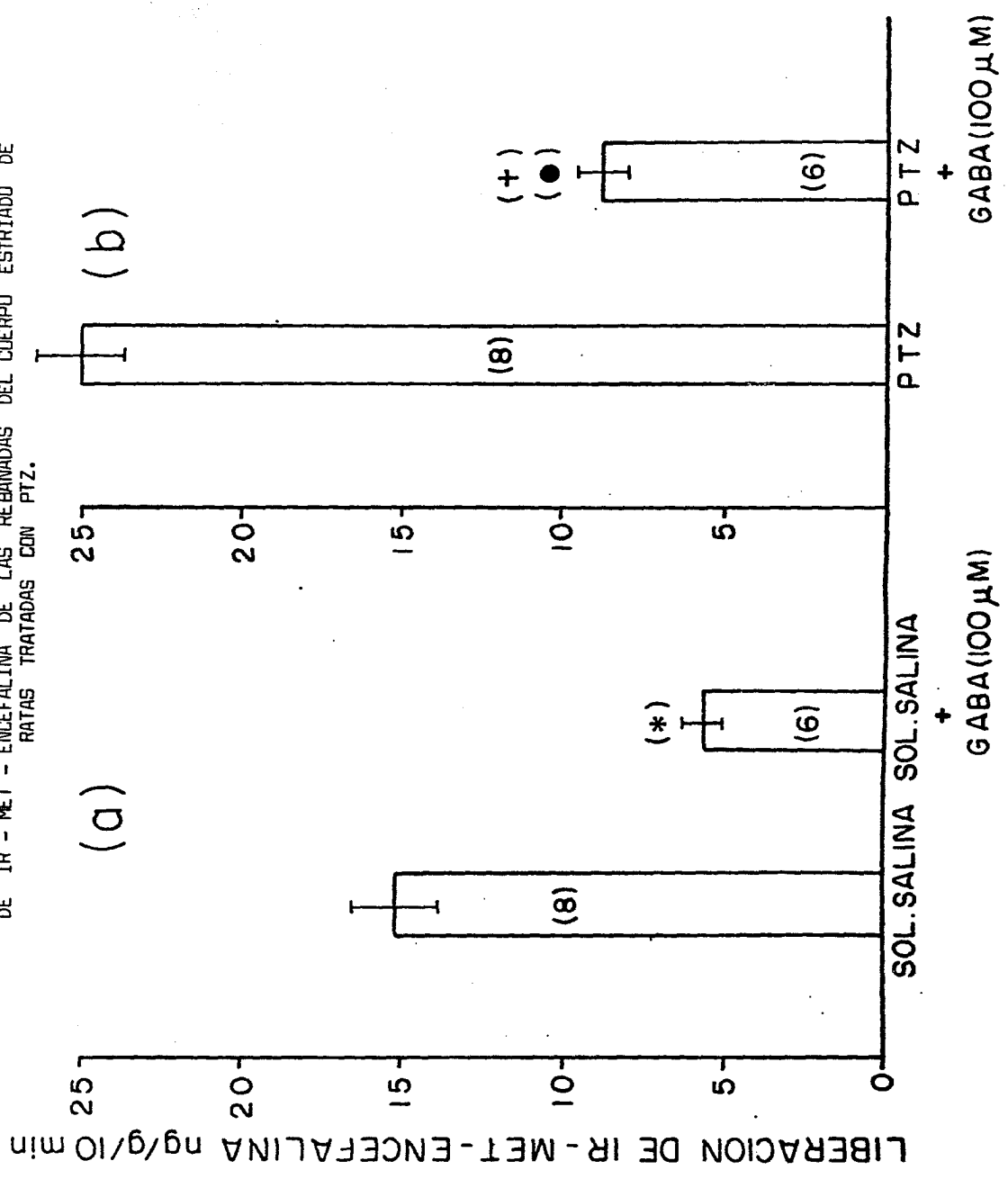


TABLA 1 .- Niveles de IR-Met-encefalina en las rebanadas y en el tejido completo del cuerpo estriado de ratas tratadas con PTZ. Efecto de la perfusión " in vitro " de GABA.

		IR - Met - encefalina ng/g de tejido		
	Control	PTZ	Control + GABA	PTZ + GABA
Rebanadas	488 ± 18 (8)	714 ± 20* (8)	495 ± 12 (6)	490 ± 32 (6)
tejido completo	1051 ± 80 (8)	1452 ± 83* (7)		

Los animales tratados con PTZ, fueron inyectados por vía i.p. con 100 mg/kg del fármaco y se sacrificaron durante la extensión tónica. El GABA (100 uM) fue agregado 20 minutos antes del estímulo despolarizante con alto K⁺, como se describe en material y métodos. Los valores representan la media ± error estandar, (número de experimentos). (*) Prueba de "t" de Student, p < 0.01 comparado con el valor control.

IV DISCUSION

Varios autores (Henderson y col. 1978, Iversen y col. 1978, Osborne y col. 1978a, Bayón y col. 1978, Ritcher y col. 1979, Sawynok y col. 1980, Linderberg y col. 1981), han reportado que la liberación de Met-encefalina aumenta en respuesta a una alta concentración de potasio y este efecto depende de la presencia de Ca^{++} . Los resultados del presente trabajo muestran que 50 mM de K^+ , durante 5 min. en presencia de fen-ala como inhibidor enzimático, aumenta de 35 a 45 veces la liberación basal de la met-encefalina en el cuerpo estriado de la rata " in vitro ". Cuando se estimuló con 22 mM de K^+ durante 10 min., el incremento en la liberación fue de 3 a 4 veces y este efecto se bloqueó al excluir el calcio del medio de perfusión.

Los resultados obtenidos con Bacitracina, durante la liberación inducida por 50 mM de K^+ , durante 5 min., fueron similares a los reportados por Osborne y col. (1980). Ahora, comparando estos datos con los que se obtuvieron con fen-ala (inhibidor selectivo de la encefalinasa) se puede observar que la cantidad recuperada de la IR-Met-encefalina durante el período de estimulación es aproximadamente tres veces mayor con el dipéptido.

No obstante cuando se hizo uso de 22 mM de K^+ , durante 10 minutos, como estímulo despolarizante y fen-ala como inhibidor enzimático en las cámaras controles, los resultados fueron semejantes a los obtenidos por Osborne y col. (1980) con bacitracina y 22 mM de K^+ .

Estos resultados están en conformidad con los hallazgos de Patey y col. (1981), quienes encontraron que la inactivación de la encefalinasa (pero no de las otras enzimas que hidrolizan a las encefalinas) da como resultado un incremento en la recuperación de la met-encefalina liberada por un agente despolarizante. La diferencia observada entre bacitracina (inhibidor de la aminopeptidasa y encefalinasa) y fen-ala en la liberación durante la exposición a 50 mM de K^+ , puede deberse a que 30 μ g/ml del primer compuesto son insuficientes para inhibir la activación de la encefalinasa que resulta de la despolarización inducida por esta elevada concentración del ión.

Diversos autores han sugerido que los péptidos opioides pueden liberarse durante la etapa ictal de una crisis convulsiva, para provocar la depresión post-ictal encefalográfica. Frenk y col. (1979) y Urca y col. (1980), han mostrado que la morfina prolonga la duración de la etapa post-ictal de las crisis convulsivas generalizadas, inducidas por el Kindling amigdalino y la inyección de PTZ, respectivamente. Tortella y col. (1981) encontraron que la naloxona reduce la duración

de la depresión post-ictal resultante de un electrochoque convulsivo. Kelsey y col. (1982) han reportado que la estimulación eléctrica masiva, con intervalos de 10 minutos, inhibe la aparición de las crisis convulsivas en el modelo epiléptico del kindling, producido por la estimulación de la amígdala y el globus pallidus. Este efecto fue bloqueado con la aplicación de naloxona, por lo tanto, los autores sugieren que la desaparición de las crisis a causa de estimulaciones masivas puede deberse, al menos en una parte, a que las endorfinas se están liberando en las crisis iniciales.

En este estudio se ha encontrado un incremento en la liberación de la IR-Met-enkefalina inducida por alto potasio, en las rebanadas de estriado de ratas sacrificadas durante la extensión tónica, después de la inyección con PTZ. Estos resultados sugieren también que las enkefalinas pueden liberarse durante la etapa ictal de una crisis convulsiva.

Los niveles elevados de IR-Met-enkefalina, tanto en las rebanadas como en los estriados completos de animales inyectados con PTZ, indican que el aumento del pentapéptido se produce por las crisis generalizadas y no por la estimulación con alto K^+ " in vitro ".

La perfusión de 100 μ M de GABA no modificó la liberación basal, pero produjo en promedio (en controles y PTZ) un decremento del 62,5% en la liberación de IR-Met-enkefalina indu

cida por alto K^+ . Estos resultados reproducen los obtenidos por Osborne y col. (1980), quienes propusieron que el GABA actúa como un modulador inhibitorio de la liberación de las encefalinas en el cuerpo estriado.

Se sabe que las crisis convulsivas debidas a la inyección de PTZ producen la inhibición del sistema gabaérgico (Matthews y Mc Cafferty 1979). Por otro lado, la aplicación de bicuculina (antagonista de GABA) aumenta la liberación " in vivo " de las encefalinas en el globus pallidus (Bourgoïn y col. 1982).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el GABA bloquea la liberación de la IR-Met-encefalina inducida por alto potasio en las rebanadas del estriado de animales tratados con PTZ. Por lo tanto, se propone que el incremento en la liberación del pentapéptido durante una crisis epiléptica puede deberse a la inhibición del sistema gabaérgico.

Asimismo se encontró que existe una diferencia significativa en la liberación de IR-Met-encefalina, después de la perfusión de GABA, entre los grupos tratados con PTZ (8.80 ± 0.68 ng/g de tejido) y los grupos controles (5.7 ± 0.40 ng/g de tejido). Esto sugiere que otros supuestos neurotransmisores pueden modificar la liberación de las encefalinas en las crisis convulsivas.

V R E F E R E N C I A S

- Adler, M. W., C. H. Lin, S. H. Keinat, S. Braverman and E. B. Geller. (1976). Anticonvulsant action of acute morphine administration in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 198: 655-660.
- Arbilla, S. and S. Z. Langer. (1979). Facilitation by GABA of the potassium-evoked release of ³H-nor-adrenaline from rat occipital cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Phar.* 306: 166-168.
- Barclay, R. K. and M. A. Phillips. (1980). Inhibition of enkephalin-degrading aminopeptidase activity by certain peptides. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 96 (4): 1732-1738.
- Bayón, A., J. Rossier, A. Mauss, F. E. Bloom, L. L. Iversen, N. Ling and R. Guillemin. (1978). In vitro release of [5-methionine] enkephalin and [5-Leucine] enkephalin from the rat globus pallidus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75-(7): 3503-3506.
- Bayón, A., W. J. Shoemaker, L. Lugo, R. Azad, N. Ling, R. Drucker-Colin and F. E. Bloom. (1981). In vivo release of enkephalin from the globus pallidus. *Neuroscience Letters* 24: 67-70.
- Benuck, M. and N. Marks. (1980). Characterization of a distinct membrane bound dipeptidyl carboxipeptidase inactivating enkephalin in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (2): 822-828.
- Bloom, F., E. O. Bettenberg, J. Rossier, N. Ling, J. Leppaluoto, T. M. Vargo and R. Guillemin. (1977). Endorphin are located in the intermediate and lobes of the pituitary, not in neurohypophysis. *Life Science* 20: 43-48.
- Bradbury, A. F., D.G. Smyth, C. R. Snell, N. J. Birdsall, and E. C. Hulme. (1976). C-Fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors. *Nature* 260 793-795.

- Bourgoin, S., F. Cesselin, F. Artaud, J. Glowinsky and H. Hamon. (1982). In vivo modulations by GABA-related drugs of met-enkephalin release in basal ganglia of the cat brain. *Brain Research* 248: 321-330.
- Caldecott-Hazard, S., Y. Sahvit, R. F. Ackermann, J. Jr. Engel, R. C. A. Frederickson and S. C. Liebeskind. (1982). Behavioral and electrographic effects of opioids on kindled seizures in rats. *Brain Research* 251: 327-333.
- Cesselin, F., P. Sourbrie, S. Bourgoin, F. Artaud, T. D. Resine, R. Michelot, J. Glowinski and M. Hamon (1981). In vivo release of met-enkephalin in the cat brain. *Neuroscience* 6 (3): 301-313.
- Erdos, E. G., A. R. Johnson and N. T. Boyden. (1978). Hydrolysis of enkephalin by cultured human endothelial cells and by purified peptidyl dipeptidase. *Biochem. Pharmac.* 27: 843-848.
- Fratte N., H. Yang, B. Majans and E. Costa. (1979). Distribution of β -Endorphin and related peptides in the hypothalamus and pituitary. *Neuroscience* 4: 1903-1908.
- Frenk, H., J. Jr. Engel, R.F. Ackherman, Y. Shavit and J. C. Liebeskind (1979). Endogenous opioids may mediate postictal behavioral depression in amygdaloid-kindled rats. *Brain Research* 167: 435-440.
- Frenk, H., E. C. Mc Carty and J. C. Liebeskind. (1978b). Different brain areas mediate the analgesic and epileptic properties of enkephalin. *Science* 200: 335-336.
- Frenk, H., G. Urca and J. C. Liebeskind. (1978a). Epileptic properties of leu and met-enkephalin: Comparison with morphine and reversibility by naloxone. *Brain Research* 147: 327-337.
- Gastaut, H. (1977). *Epilepsias*. 5^{ed}, Editorial Universitario de Buenos Aires. Argentina. pp. 138.
- Giraud, P., D. Castanas, G. Patry, C. Oliver and J. Rossier. (1983). Regional Distribution of Methionine-Arg⁶-Phe⁷ in the rat brain: Comparative study with the distribution of other opioid peptides. *J. Neurochemistry* 41 (1): 154-160
- Glowinsky, J. and L. L. Iversen. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J. Neurochemistry* 13: 655-669.

- Goldstein, A., L. I. Lowney and B. K. Pal. (1971). Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68 (8): 1742-1747.
- Goldstein, A., S. Tachibana, L. I. Lowney, M. Hunkapiller and L. Hood. (1979). Dynorphin- (1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 (12): 6666-6670.
- Gorenstein, C. and S. H. Snyder. (1979). Two distinct enkephalinases: solubilization, partial purification and separation from angiotensin converting enzyme. *Life Science* 25: 2065-2070.
- Gubler, V., P. Seeburg, B. J. Hoffman, L. P. Gage and S. Udenfriend. (1982). Molecular cloning establishes pro-enkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* 295: 206-208.
- Hambrook, J.M., B. A. Morgan and M. Rance. (1976). Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature* 262: 782-783.
- Henderson, G., J. Hughes and H.W. Kosterlitz. (1978). In vitro release of Leu- and Met-enkephalin from the corpus striatum. *Nature* 271: 677-679.
- Hersh, L. B. (1982). Degradation of enkephalins: the search for an enkephalinase. *Mol. Cel. Biochem.* 47: 35-43.
- Hong, J. S., J. C. Guillin, H.-Y. T. Yang and E. Costa. (1979). Repeated electroconvulsive shocks and the brain content of endorphins. *Brain Research* 177: 273-278.
- Hong, J. S., P. L. Wood, H-Y. T. Yang and E. Costa. (1980). Recurrent convulsions and hippocampal (Met⁵)-enkephalin content. In: *Neural peptides and neuronal communication*. E. Costa and M. Trabucchi. Raven Press. New York. pp. 385-397.
- Hughes, J. (1975). Isolation of a endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Research* 88: 295-308.
- Hughes, J., H. W. Kosterlitz and T. W. Smith. (1977). The distribution of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the rat brain and peripheral tissues. *Br. J. Pharmac.* 61: 639-647.

- Hughes, J., T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan and H. R. Morris. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579.
- Iversen, L. L., S. D. Iversen, F. E. Bloom, T. Vargo and R. Guillemin. (1978). Release of enkephalin from rat globus pallidus in vitro. *Nature* 271: 679-681.
- Kakidani, H., Y. Furutani, A. Takahushi, M. Noda, Y. Morimoto, T. Hirose, M. Asai, S. Inayama, S. Nakanishi and S. Numa. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine B-neoendorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298: 245-249.
- Kanagawa, K. and H. Matsuo. (1979). α -Neo-endorphin: A "Big" Leu-Enkephalin with potent opiate activity from porcine hypothalamus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86 (1): 153-160.
- Kelsey, J. E. and J. D. Belluzzi. (1982). Endorphin mediation of post-ictal effects of kindled seizures in rats. *Brain Research* 253: 337-340.
- Kilpatrick, D. L., A. Wahlstrom, H. W. Lahm, R. Blacher and S. Udenfriend. (1982). Rimorphin, a unique, naturally occurring [leu] enkephalin-containing peptide found in association with dynorphin and α -neo-endorphin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6480-6483.
- Kuhar, M. J., C. B. Pert and S. H. Snyder. (1973). Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature*, 245: 447-450.
- Le Galle La Salle, G., B. Calvino and Y. Ben Ari. (1977). Morphine enhances amygdaloid seizures and increases in terictal spike frequency in kindled rats. *Neuroscience Letters* 6: 255-260.
- Li, C. H. (1964). Lipotropin, a new active peptide from pituitary glands. *Nature* 201: 924
- Lindberg, L. J., and L. Dahl. (1981). Characterization of enkephalin release from rat striatum. *J. Neurochemistry* 36 (2): 506-512.
- Ling, N., R. Burgus and R. Guillemin. (1976). Isolation, primary structure, and synthesis of α -endorphin and γ -endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73 (11): 3942-3946.

- Mains, R. E., B. A. Eipper and N. Ling. (1977). Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 3014-3018.
- Malfroy, B., J. P. Swertz, A. Guyon, B. P. Roques and J. C. Schwartz. (1978). High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* 276: 523-526.
- Malfroy, B., J. P. Swertz, C. Llorrens and J. C. Schwartz. (1979). Regional distribution of a high-affinity enkephalin-degrading peptidase (enkephalinase) and effects of lesions suggest localization in the vicinity of opiate receptor in brain. *Neuroscience Letters* 11: 329-334.
- Mammino, R. A. and H. H. Wolf. (1974). Opiate receptor: Proconvulsant action of morphine in the mouse. *Life Science* 15: 2089-2096.
- Matthews, W. D. and G. P. McCafferty. (1979). Anticonvulsant activity of muscimol against seizures induced by impairment of GABA-mediated neurotransmission. *Neuropharmacology.* 18: 885-889.
- Mc. Guigan, N. and E. L. Ross. (1915). The similarity and synergy of morphine and strychnine action. *J. Pharmacology. Exp. Ther.* 7: 385-405.
- Miller, R. J., K. Chang, B. Cooper and P. Cuatrecasas. (1978). Radioimmunoassay and characterization of enkephalins in rat tissues. *J. Biol. Chem.* 253 (2): 531-538.
- Minamino, N., K. Kanagawa, N. Chino, S. Sakakibara and H. Matsuo. (1981). β -neo-endorphin a new hypothalamic "Big" leu-enkephalin of porcine origin: Its purification and complete amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99 (3): 864-870.
- Neal, H. and P. E. Keane. (1978). The effect of local microinjection of opiates and enkephalins into the forebrain on the electrocortigram of rat. *Electroen. Clin. Neurophysiol.* 45: 655-660.
- Noda, M., Y. Furutani, H. Takahashi, M. Toyosato, T. Hirose, S. Inayama, S. Nakanishi and S. Numa. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295: 202-206.

- Osborne, H. and A. Herz. (1980). K^+ Evoked release of met-enkephalin from rat striatum in vitro: Effect of putative neurotransmitters and morphine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310:203-209.
- Osborne, H., V. Höllt and A. Herz. (1978a). Subcellular distribution enkephalins and endogenous opioid activity in rat brain. *Life Science.* 22: 611-618.
- Osborne, H., V. Höllt and A. Herz. (1978b). Potassium-Induced release of enkephalins from rat striatal slices. *J. Pharmacol.* 48: 219-221.
- Patey, G., S. De La Baume, J. C. Schwartz, C. Gros, B. Roques, M. C. Fournie-Zalusky and E. Soroca-Lucas, (1981). Selective protection of methionine enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition. *Science* 212: 1153-1155.
- Pert, C. B., and S. H. Snyder. (1973). Opiate receptor: Demonstration in Nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014.
- Ritcher, S. A., D. L. Wesche and R. G. A. Frederickson. (1979). K^+ -Stimulated release of Leu- and Met-enkephalin from rat striatal slices: Lack of effect of morphine and naloxone. *Eur. J. Pharmacol.* 56: 105-113.
- Rossier, J. and F. Chapouthier. (1982). Brain opiates endeavour. *New series, volume 6, No. 4.* Pergamon Press printed in Great Britain. 168-176.
- Sawynok, J., F.S. Labella and C. Pinsky. (1980). Effects of morphine and naloxone on the K^+ -stimulated release of methionine-enkephalin from slices of rat corpus striatum. *Brain Research.* 189: 483-493
- Schwartz, J. H. (1981). Chemical Basis of synaptic transmission. In: *Principles of neural science.* Kandel E.R. and J. H. Schwartz. Elsevier North Holland, Inc. New York: pp. 106-120.
- Simantov, R., A. M. Snowman and S. H. Snyder. (1976). A morphine-like factor "enkephalin" in rat brain: Subcellular localization. *Brain Research.* 107: 650-657.
- Snead, III O.C., and L. J. Bearden. (1980). Anticonvulsants specific for petit mal antagonize epileptogenic effect of leucine enkephalin. *Science* 210: 1031-1033.

- Snyder, S. H. (1981). Los receptores de los opiáceos y sustancias opiáceas endógenas. En: El cerebro. 2a. ed. Editorial Labor S.A., España. pp. 154-168.
- Sprick, U., M.-S. Oitzl, K. Ornestein and J. P. Huston. (1981). Spreading depression induced by microinjection of enkephalins into the hippocampus and neocortex. Brain Research 210: 243-248.
- Swertz, J. P., R. Perdrisot, G. Patey, S. De La Baume and J. C. Schwartz. (1979). "Enkephalinase" is distinct from brain "Angiotensin-converting enzyme". Eur. J. Pharmacol. 57: 279-281.
- Tapia, R. (1975). Biochemical pharmacology of GABA in CNS In: Handbook of psychopharmacology. L. L. Iversen S. D. Iversen and S. H. Snyder. Plenum Press, New York. pp. 1-58.
- Tortella, F. C., A. Cowan, G. L. Belenky and J. W. Holladay. (1981). Opiate-like electroencephalographic and behavioral effect of electro convulsive shock in rats. Eur. J. Pharmacol. 76: 121-128.
- Traficante, L. J., J. Rotrosen, J. Siekierki, H. Tracer and S. Gershon. (1980). Enkephalin inactivation by N-terminal tyrosine cleavage: Purification and partial characterization of a highly specific enzyme from human brain. Life Science 26: 1697-1706.
- Urca, G. and H. Frenk. (1980). Pro- and anticonvulsant action of morphine in rats. Pharmacol. Biochem. Behav 13: 343-347.
- Urca, G., H. Frenk, J. C. Liebeskind and A. N. Taylor. (1977). Morphine and enkephalin: Analgesic and epileptic properties. Science 197: 83-86.
- Vindrola, O., M. Asai, M. Zubieta and G. Linares. (1983). Brain content of immunoreactive (Leu⁵)-enkephalin and (Met⁵)-enkephalin after pentylenetetrazol-induced convulsions. Eur. J. Pharmacol. 90: 85-89
- Vindrola, O., M. Asai, M. Zubieta, E. Talavera, E. Rodríguez and G. Linares. (1984). Pentylenetetrazol Kindling produces a long lasting elevation of IR-Met-enkephalin but not IR-leu-enkephalin. Brain Research. 297: 121-125.

- Vindrola, O., R. Briones, M. Asai and A. Fernández-Guardiola. (1981). Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in rat brain. *Neuroscience Letters* 21: 39-43.
- Viveros, O. H., E. J. Diliberto, E. Hazum and K. J. Chang. (1980). Enkephalins as possible adrenomedullary hormones: storage, secretion, and regulation of synthesis. In: *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. E. Costa and M. Trabucchi. Raven Press. New York. pp. 1-13.
- Yang, J., J. S. Hong and E. Costa. (1977). Regional distribution of leu and met enkephalin in rat brain. *Neuropharmacology*. 16: 303-307.
- Yang, H. and N. H. Neef. (1972). Distribution and properties of angiotensin converting-enzyme of rat brain. *J. Neurochem.* 19: 2443-2450.