

Modulación endorfinérgica de los procesos de sensibilización nerviosa

Augusto Fernández-Guardiola*

Summary

Endogenous opioids (EO) effects related to sensory information modulation and epileptogenesis are described. Based on the hypothesis of EO playing this modulator or "filter" role, previous experiments in the visual pathway are described in which naloxone (opiate antagonist) produced an amplitude increment of the visual evoked potentials (VEP) in the temporal lobe amygdala. The VEP amplitude increment was also observed by means of brief low-intensity, repeated electrical stimulation (kindling procedure) of some limbic and visual structures. Again, this increment was intensified by the administration of naloxone.

Previous works related to the effects of opioid antagonist administration alone or during the development of the amygdaloid kindling in *encephale isolé* preparations and intact free moving cats without anesthesia, are reviewed. In both cases, naloxone facilitated the epileptogenesis.

Another sensibilization model documented is the application of the kindling method to the interneuron pathways of the presynaptic inhibition that have properties corresponding to a complex circuitry. The plasticity phenomena becomes evident in the spinal cord through the post-tetanic potentiation and habituation processes. We found that the short and repeated stimulation of the afferent cutaneous and muscular nerves produced progressively amplitude increase of the polysynaptic reflexes. The previously intensified reflexes by the afferent repetitive stimulation were further enhanced by naloxone administration.

Resumen

Se describen las posibles acciones de los opioides endógenos (OE) en el sistema nervioso central (SNC), en relación con la modulación de la información sensorial y la epileptogénesis. Partiendo de la hipótesis de que los OE puedan desempeñar este papel modulador o de "filtro", se describen trabajos anteriores sobre la vía visual del gato, en los que se demostró que los antagonistas (naloxona) producen un incremento de los potenciales evocados visuales (PEVs), sobre todo en la amígdala del lóbulo temporal. Este incremento de los PEVs pudo lograrse también por la estimulación eléctrica repetida de estructuras límbicas y visuales, y pudo intensificarse por la naloxona.

Se revisan los trabajos anteriores sobre los efectos de los antagonistas opiáceos administrados solos o durante el desarrollo, y la expresión del *kindling* amigdalino (estimulación eléctrica débil, breve y diaria de la amígdala del lóbulo temporal) en el gato, en preparaciones *encephale isolé* e íntegro, no anestesiado, libre de movimientos. En todos los casos, la naloxona facilitó la epileptogénesis.

Otro modelo que se describe es la aplicación de la metodología del *kindling* a la vía de interneuronas de la inhibición presináptica que posee propiedades que corresponden a una circuitería compleja, habiéndose postulado como la más simple para la despolarización de aferentes primarias en la médula espinal. Los fenómenos de plasticidad se hacen evidentes en la médula por la presencia de potenciación posttetánica por un lado y la habituación por el otro. Se encontró que estimulando en forma repetida y breve, los nervios gastrocnemio, sural y peroneo se produce un crecimiento progresivo de las respuestas polisinápticas. La naloxona aumenta aún más la amplitud de los reflejos, previamente intensificados por la estimulación repetida de los nervios aferentes.

Introducción

Un hecho general que llama la atención y que ha servido para conocer más a fondo la organización del sistema nervioso central (SNC) es que ciertos alcaloides vegetales poseen correlatos funcionales en tejidos animales; particularmente nos interesan aquellos que se encuentran en el SNC. Estos alcaloides tienen semejanzas estructurales con sus respectivas moléculas animales, pero son mucho más resistentes a la inactivación enzimática que sus versiones animales. Lo que les confiere propiedades neurotóxicas. Existen numerosos de estos "pares", por ejemplo, la muscarina y la acetilcolina; o el muscimol y el ácido gamma-aminobutírico (GABA), que comparten los mismos receptores en la membrana neuronal. Una relación reciente es la establecida entre los opiáceos, naturales o sintéticos (morfina, pentazocina) y los opioides endógenos (OE) (15). Estas verificaciones farmacológicas, aunadas al hallazgo de receptores, enzimas, agonistas y antagonistas específicos, ha constituido un campo de exploración muy fructífero, que continúa descubriendo compuestos endógenos que explican los efectos fisiológicos y conductuales de muchos fármacos, sobre todo psicotrópicos.

Desde hace varios años se ha centrado la atención en los OE, sobre todo en las encefalinas (Leu y Met) como moduladores de funciones específicas cerebrales (14,17,18,19,24,26,27). Varias investigaciones demuestran que los efectos de estas sustancias van más allá del exclusivo papel controlador de la nocicepción originalmente adscrito a estos pentapéptidos. Se ha sugerido que participan en la instalación del estrés, en funciones cardio-respiratorias y en el desarrollo de la epileptogénesis. En general, influyen sobre la

* División de Investigación en Neurociencias. Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calz. México-Xochimilco, 101. San Lorenzo Huipulco 14370, México D.F.

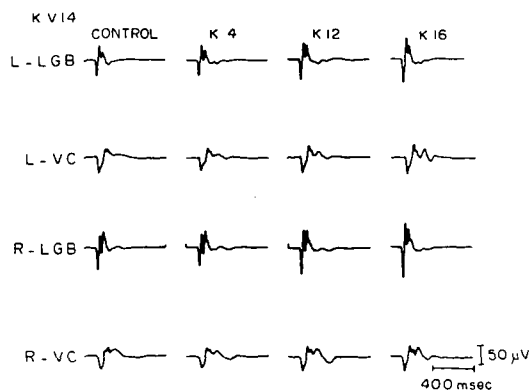


Figura 1. Kindling de la vía visual. Se estimuló el quiasma óptico cada 20 minutos (200 microamperios, 100 Hz, 2 pulsos de 2 milisec. durante 2 segundos) y después se aplicaron 32 estímulos luminosos promediándose las respuestas. L,R-LGB, cuerpo geniculado lateral izquierdo y derecho; L,R-VC, corteza visual izquierda y derecha. K4, K12, K16, ensayos de kindling. Nótese el aumento bilateral de la amplitud de las respuestas visuales corticales y subcorticales. (tomado de 5).

excitabilidad neuronal y esto se ha demostrado en diferentes especies animales (20), incluso en los invertebrados. Hay numerosos reportes sobre la colocación en cuerpos celulares o en terminales (sinaptosomas) de los OE con dopamina o serotonina, lo que hace que estos compuestos sean candidatos a desempeñar un papel modulador de varias funciones, como los procesos adictivos, los cambios de comportamiento y, especialmente, la instalación de la potenciación sináptica de larga duración y en los fenómenos

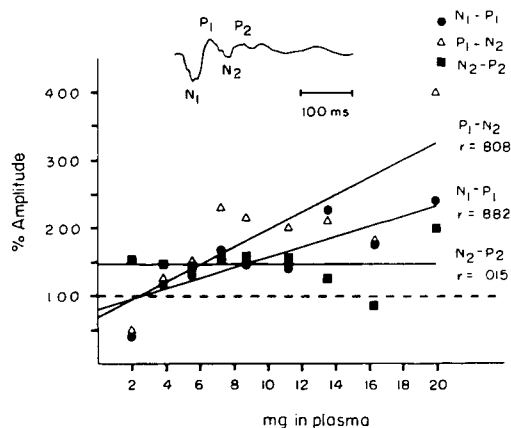


Figura 2. Potenciales evocados visuales (VEPs) y naloxona (tomado de 8). Cambios en la amplitud de los componentes de los potenciales registrados en la corteza visual, durante la administración repetida de naloxona (2mg, IV). La figura superior muestra un promedio de los potenciales visuales, provocados por la estimulación luminosa a una frecuencia de 1 Hz. Se indican los componentes analizados. La parte inferior muestra una gráfica en la cual la cantidad de naloxona por volumen total de plasma, se representa en las abscisas, y el porcentaje del aumento, en la amplitud de los diversos componentes de los VEPs.

de alteración del umbral convulsivo (5,6,8,9,13,14). En muchos estudios se ha tratado de identificar el papel de los OE como neurotransmisores en un sentido estricto. Cuando se han hecho a nivel celular, la mayoría de ellos parece demostrar un papel de inhibición de la transmisión excitatoria. Por ejemplo, la liberación del péptido endógeno, dinorfina, bloquea la sinápsis vía perforante-células granulosas del dentado hipocámpico, actuado sobre los receptores Kappa e impidiendo así la instalación de la potenciación sináptica de larga duración (LTP), como demostraron Wagner y col. (29). También, utilizando un antagonista inespecífico (naloxona) y un antagonista selectivo de los receptores mu (cyprodine) se ha demostrado que los receptores de los OE están involucrados en las acciones anticonvulsivantes de la fenitoina y del etanol. Otras experiencias sugieren que los OE son responsables de la depresión electroencefalográfica y de la inmovilidad post-críticas (Pellicer y col, 22). Recientemente, se ha demostrado la acción anticonvulsivante de la metionina encefalina endógena, en el modelo de ratones de la cepa E1, susceptibles a crisis convulsivas (Koide y col, 18).

Nosotros centramos nuestra atención en las posibles acciones de control de la epileptogénesis que puedan presentar los OE. Estos estudios han sido de difícil interpretación ya que han sido realizados empleando múltiples modelos de epilepsia experimental, diferentes agonistas y antagonistas de distintos receptores a opiáceos y vías de administración también diferentes. En relación con este último punto, son notables los efectos opuestos que se encuentran al emplear la vía intra-cerebro ventricular (ICV) o las vías peritoneal (IP) o endovenosa (IV). A todo esto hay que agregar la complejidad intrínseca del proceso de epileptogénesis —con sus características ictales, post-ictales e interictales, localizadas o generalizadas, crónicas o agudas etc., que no siempre son bien conocidas ni tomadas en cuenta por los diversos grupos que han llevado a cabo los experimentos farmacológicos o neuroquímicos. Por esta razón pensamos que para establecer los efectos convulsivantes o anticonvulsivantes de una sustancia, es deseable elegir un sólo modelo de epilepsia experimental y agotar todas las posibilidades.

La modificación permanente de la excitabilidad cerebral que se induce por la estimulación repetida, breve y de baja intensidad del sistema límbico *kindling* (Goddard y col, 11) se ha desarrollado como un nuevo campo en la exploración de la plasticidad neuronal y la reorganización funcional. Esta técnica de estimulación eléctrica tetánica (60-100 Hz), breve (1 a 2 segundos), espaciada (de preferencia cada 24 Hrs), ha sido de gran utilidad para producir una potenciación sináptica de larga duración (LTP) y modificaciones trans-sinápticas que culminan siempre, en todos los mamíferos hasta ahora estudiados en crisis convulsivas generalizadas, en una secuencia específica e irreductible.

En relación con el fenómeno general de la plasticidad del SNC, del cual el *kindling* es un ejemplo, la mayor parte de los trabajos se han hecho sobre las vías monosinápticas, pero los circuitos polisinápticos

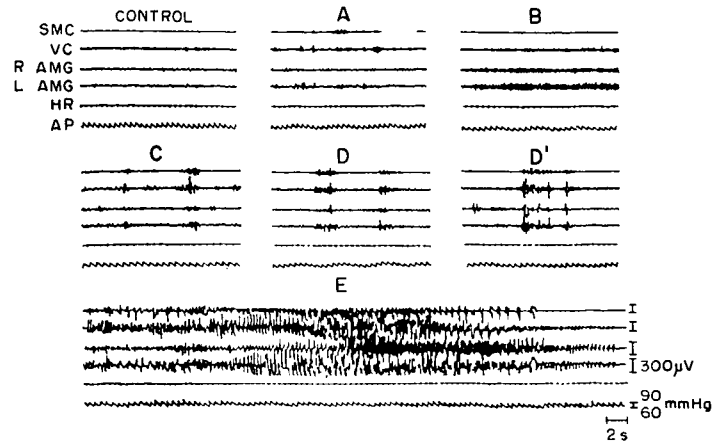


Figura 3. Naloxona sola y paroxismos. Cambios electrográficos progresivos producidos por la inyección i.v. repetida de 2 mg/Kg de naloxona cada 15 minutos. SMC, Corteza sensorio-motora; VC, Corteza visual; R-L AMG, Amígdala derecha e izquierda del lóbulo temporal; HR, Frecuencia cardíaca; AP, Presión arterial. A-Actividad de "husos" lentos en SMC y VC, después de la segunda dosis; B- Actividad rítmica a 12 Hz en ambas amígdalas, después de la cuarta dosis; C-Ondas agudas de alto voltage (más de 300 microvoltios), bilaterales y sincrónicas, registradas en todas las estructuras después de la dosis 18; D y D'-Actividad paroxística después de las dosis 26 y 36 respectivamente; E-Crisis electrográfica generalizada después de la dosis 36. Nótese que no aparece la depresión postictal y que HR y AP permanecen sin cambios ostensibles (tomado de 8 y 22).

han ofrecido resultados de un mayor interés comportamental. Muchos subsistemas del SNC, muy conocidos, proporcionan resultados del *kindling* mono y polisináptico. En este sentido, la estructura más estudiada ha sido el hipocampo, estimulado a través de la vía perforante.

Nosotros logramos analizar el efecto *kindling* en la vía visual, estimulando el quiasma óptico, activando en forma monosináptica el cuerpo geniculado lateral, transinápticamente la corteza visual y antidròmicamente la retina (5). En ese trabajo utilizamos la respuesta eléctrica visual provocada por un *flash*, como prueba del efecto *kindling*, y encontramos un aumento bilateral de estas respuestas a través de toda la vía visual (fig. 1).

La estimulación sensorial repetida se ha utilizado por décadas para provocar epilepsia refleja, al activar zonas corticales de proyección, previamente sensibilizadas, artificialmente o por procesos patológicos. Partiendo de la hipótesis de que los OE pueden desempeñar un papel modulador o de "filtro" de la información sensorial, realizamos varias series de experimentos en el gato en preparación "encéfalo aislado" (8,23). En una de ellas (23) logramos demostrar que los antagonistas de los opioides endógenos producen un incremento de los potenciales evocados en las vías visuales principal y accesoria, aumentando su amplitud y componentes tardíos en las regiones subcorticales (tubérculos cuadrigéminos, formación reti-

cular del tallo cerebral y amígdala del lóbulo temporal) (fig. 2).

Siguiendo esta línea de la precipitación sensorial de la actividad paroxística y en vista de la potenciación observada de las respuestas visuales en los sistemas límbico y reticular, decidimos explorar si la administración repetida de naloxona podía facilitar la precipitación sensorial de crisis focales y generalizadas (8). Para ello probamos el efecto de la naloxona sola (NA, 2, 4, 8 mg/Kg, cada 15 minutos) y de la naloxona más la estimulación luminosa intermitente (NPS) a 1, 3 y 10 Hz en la preparación encéfalo aislado del gato. Se utilizó la técnica de potenciales evocados y el análisis de espectro de potencia. La actividad eléctrica de la corteza sensoriomotora, de la corteza visual y de ambas amígdalas del lóbulo temporal reveló cambios progresivos a medida que se administraba la naloxona. Estos fueron: A) actividad lenta en forma de husos (4-6Hz). B) actividad rítmica a 12 Hz en ambas amígdalas. C) paroxismos generalizados y D) crisis electrográficas espontáneas tonicoclónicas generalizadas. Estos cambios se presentaron en ambos grupos experimentales y su aparición estuvo relacionada con la dosis de naloxona que se empleó. La estimulación luminosa intermitente provocó siempre los fenómenos descritos. La amplitud de los potenciales evocados y el espectro de potencia mostraron un incremento progresivo (figs. 3 y 4). Estos resultados confirman el papel facilitador de la epileptogénesis de

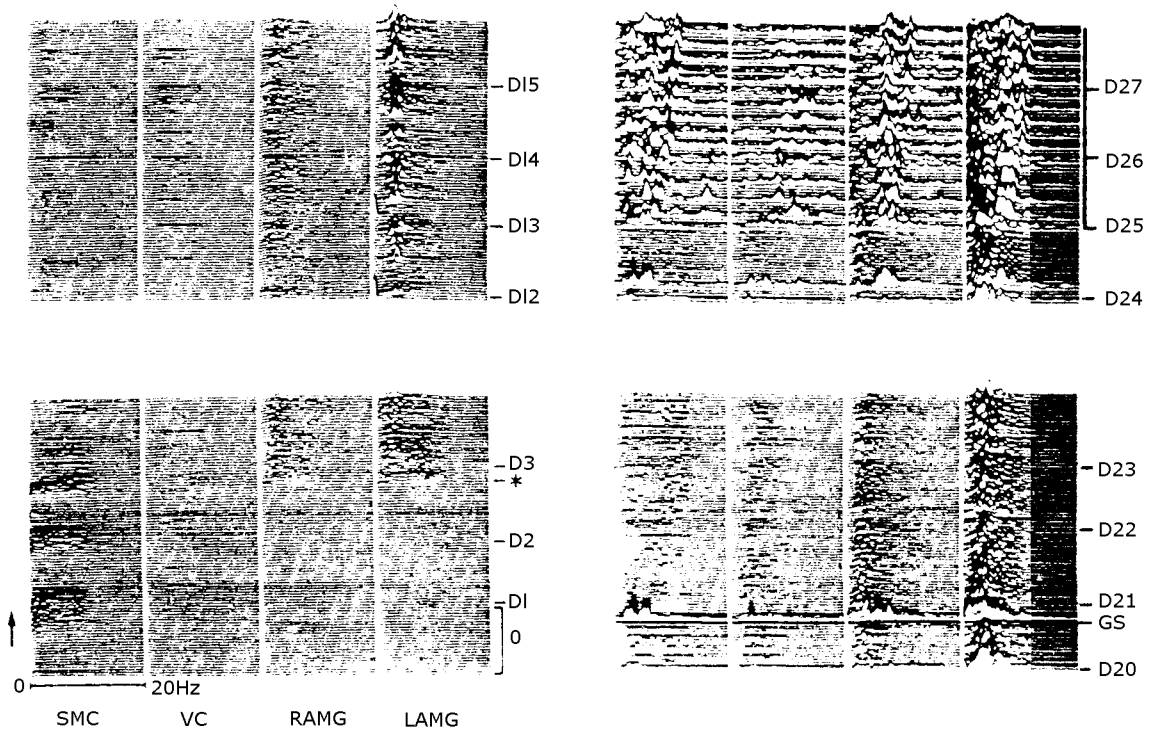


Figura 4. Naloxona sola. Efecto de la estimulación luminosa intermitente. Espectro de potencia (EP, de 0 a 20 Hz). Efecto de la dosis de naloxona de 4 mg/Kg. cada 15 minutos. Se registraron las mismas estructuras de la figura 3. D-dosis, GS-Crisis generalizadas. Cada línea de las ordenadas de las cuatro columnas representa el espectro de potencia de 10 segundos de adquisición (256 puntos/segundo/canal). Después de la doceava dosis, se hace evidente un incremento del EP en las frecuencias bajas, pero a medida que se aumenta el número de dosis se incrementa el rango de frecuencias (de 3 a 14 Hz). Las GS aparecen después de la dosis 26.

la naloxona y la posible función moduladora de los OE sobre la transmisión aferente visual.

Efectos de los antagonistas a opiáceos en el *kindling* de la amígdala del lóbulo temporal

La mayoría de los efectos estudiados acerca de la acción de los opiáceos endógenos sobre la epileptogénesis es indirecta. Al buscarla tuvimos la fortuna, en 1981, de realizar medidas de los OE durante el *kindling* amigdalino (28), encontrando que la Leu-enkefalina aumenta progresivamente durante la evolución del *kindling*, mientras que la Met-enkefalina lo hace cuando ya se instalaron las crisis convulsivas generalizadas.

Durante el *kindling* se ha reportado también un aumento de la proencefalina mRNA, Met5-enkefalina-Arg6-Gly7-Leu8 y de la colecistoquinina en el hipocampo, amígdala, corteza entorrinal, núcleo *accumbens*, corteza frontal y sustancia *nigra* (ladorola y col, 16; Naranjo y col, 21).

Este aumento del contenido de opiáceos podía ser interpretado como un papel convulsivante o anticonvulsivante. Nosotros optamos por la segunda hipótesis e hicimos experimentos con naloxona en el *kindling* compactado en la preparación "Encéfalo aislado" del gato (9). También, como ya hemos señalado, para conocer el papel modulador de los OE sobre el

procesamiento sensorial, exploramos el efecto facilitador de la naloxona sobre la precipitación de crisis focales y generalizadas, inducidas por la estimulación fótica iterativa (8).

Estudiamos el efecto de la administración repetida I.V. de naloxona en el gato, en preparación encéfalo aislado, sometido a *kindling* eléctrico de la amígdala del lóbulo temporal. La naloxona, en diversas dosis, se administraba 5 minutos antes del ensayo del *kindling*. Se encontró que es posible completar el proceso del *kindling* en la preparación encéfalo aislado, con un intervalo interestímulo de 15 minutos. El incremento de la duración, frecuencia y propagación de la post-descarga (PD), propias del *kindling*, se acentuó notablemente por la naloxona, la que también produjo un aumento en la amplitud del primer potencial evocado por el "tren" de estímulos eléctricos. Con la naloxona se redujo en una forma dosis-respuesta el número de ensayos necesarios para alcanzar la generalización de las crisis. Las figuras 5 y 6 ilustran el efecto facilitador de la naloxona sobre el *kindling* amigdalino.

El *kindling* de la médula espinal

Otro modelo bien conocido para estudiar los reflejos mono y polisinápticos, es la médula espinal. En ella, la vía de interneuronas de la inhibición presináptica posee propiedades que corresponden a una circuitería

Naloxone 2 mg/Kg x Trial

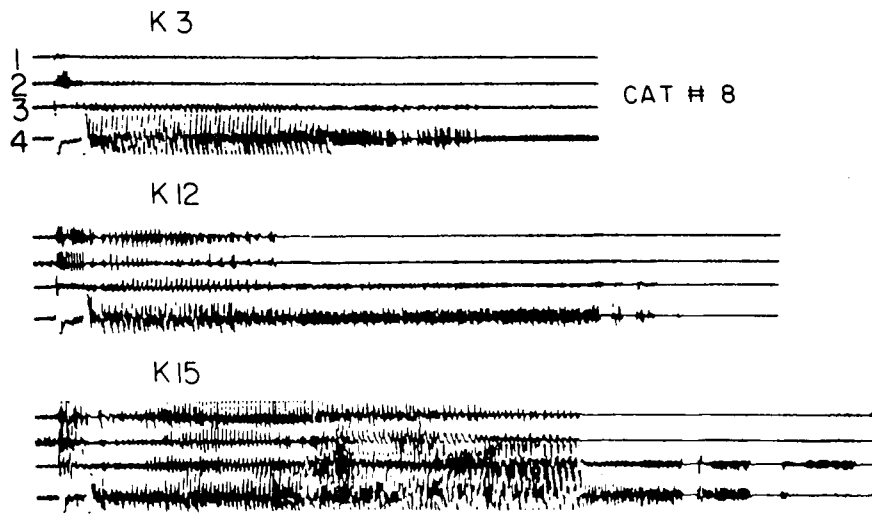


Figura 5. Efecto de la administración repetida de naloxona (2 mg/Kg), sobre el desarrollo del *kindling* en la preparación "encefalo aislado" del gato. 1, 2, 3 y 4, Corteza motora, corteza visual, amígdala derecha y amígdala izquierda (estimulada), respectivamente. Nótese la propagación de la postdescarga en el ensayo 12 (K12) y la crisis generalizada en K15.

compleja, con una o más sinapsis en serie, y se ha postulado que tales vías son las más simples para la despolarización de las aferentes primarias en la médula espinal. Rudomin y Dutton (25) demostraron, en el gato espinal no anestesiado, que estas vías exhiben una actividad espontánea considerable que causa fluctuaciones de la excitabilidad en las fibras terminales aferentes primarias.

Teniendo en cuenta estas características espinales, pensamos que tal vez sería posible realizar una especie de *kindling* de la médula, estimulando con los parámetros descritos para este modelo, es decir, con baja intensidad, iteratividad, brevedad, etc, diversos

nervios aferentes de la extremidad inferior, así como habíamos hecho antes con la vía visual. Los fenómenos de plasticidad en la médula espinal se hacen evidentes por medio de la potenciación post-tetánica por un lado y la habituación por el otro (7). Estos procesos dependen estrictamente del tipo de estimulación. Mientras que la estimulación tetánica (100-200 Hz) de los nervios aferentes induce la potenciación post-tetánica de los reflejos espinales –con un considerable aumento en la amplitud y disminución de la latencia–, la aplicación, por largos periodos, de choques eléctricos simples, de baja intensidad y frecuencia, da lugar a un fenómeno de habituación, con una considerable reducción de la amplitud de los reflejos y alargamiento de su latencia.

Puesto que como hemos visto, la estimulación repetida de baja intensidad produce una facilitación sináptica y transináptica de larga duración, pensamos en la posibilidad de reproducir un efecto semejante al *kindling* cerebral en la médula espinal (6). Desde luego, en este caso no esperábamos el desarrollo de crisis convulsivas generalizadas, pero sí un aumento duradero de la amplitud de los reflejos, inducido por la estimulación iterativa umbral.

Considerando lo anterior, el objeto de esta investigación fue el estimular las vías aferentes a la médula, analizando las respuestas mono y polisinápticas, en gatos paralizados, que tuvieran una sección espinal alta. Utilizamos atropina, basándonos en la bien conocida participación colinérgica en estos sistemas sinápticos, y naloxona por los efectos potenciadores de los reflejos encontrados en gatos espinales no estimulados (Bell y Martin, 1; Catley y col, 2; Clarke y col, 3; Goldfarb y Hu, 12). Por otra parte, se ha demostrado que la naloxona facilita el *kindling* amigdalino (13). Además, lo que principalmente nos incitó a usar los

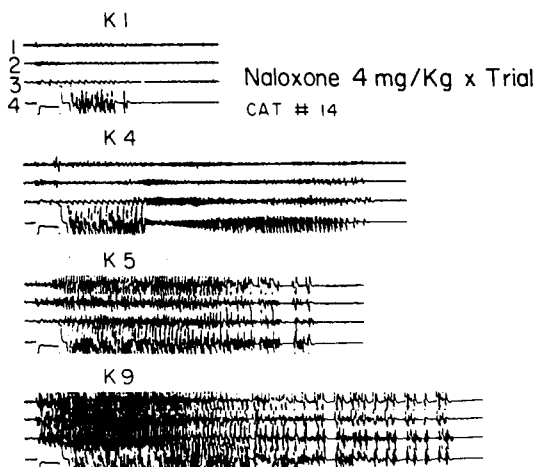


Figura 6. Efecto de la administración repetida de naloxona (4 mg/Kg) sobre el desarrollo del *kindling* (la misma preparación y las mismas derivaciones que en la figura 5) Nótese la crisis generalizada en K5, y su exacerbación en K9.

PERONEAL NERVE KINDLING

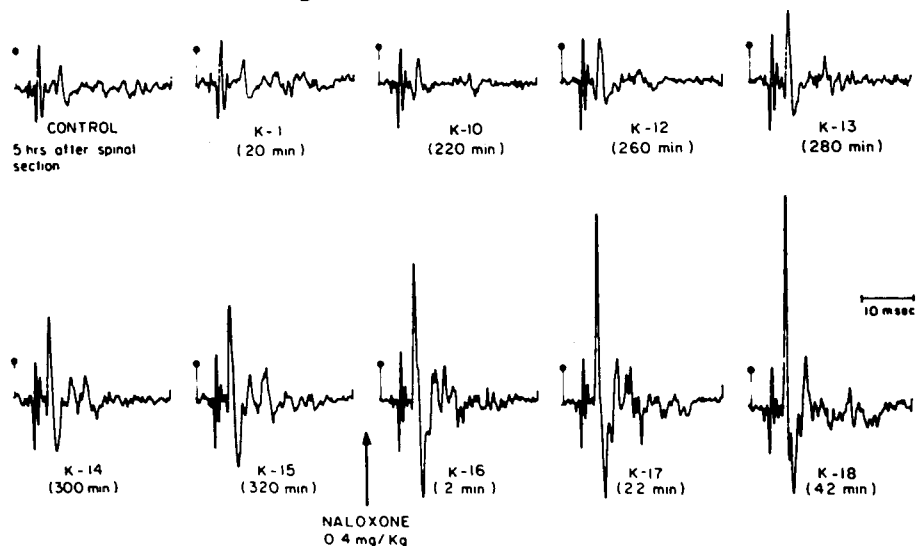


Figura 7. Promedio de reflejos mono y polisinápticos inducidos por la estimulación con choques eléctricos simples del nervio peroneo, en control (tiempo 0) y después de cada ensayo de *kindling* (Kn). Cada potencial es el promedio de 16 respuestas promediadas. Nótese el incremento ligero del reflejo monosináptico y el más intenso del polisináptico. Después de la administración de naloxona, las respuestas polisinápticas crecen aún más, mientras que las monosinápticas disminuyen.

antagonistas a opiáceos fue el ya mencionado descubrimiento inicial, en nuestro laboratorio, de los aumentos de Leu y Met-enkefalinas en el *kindling* amigdalino de la rata (Vindrola y col, 28). Los contenidos de Leu-enkefalina suben en forma progresiva durante el *kind-*

ling, no así los de Met-enkefalina, que parecen crecer solamente al final del proceso, cuando ya han aparecido las crisis convulsivas generalizadas.

Los experimentos se llevaron a cabo en gatos en preparación espinal (sección de la médula) (C6-C7),

SURAL NERVE KINDLING
GASTROCNEMIUS NERVE TEST (2 min delay)

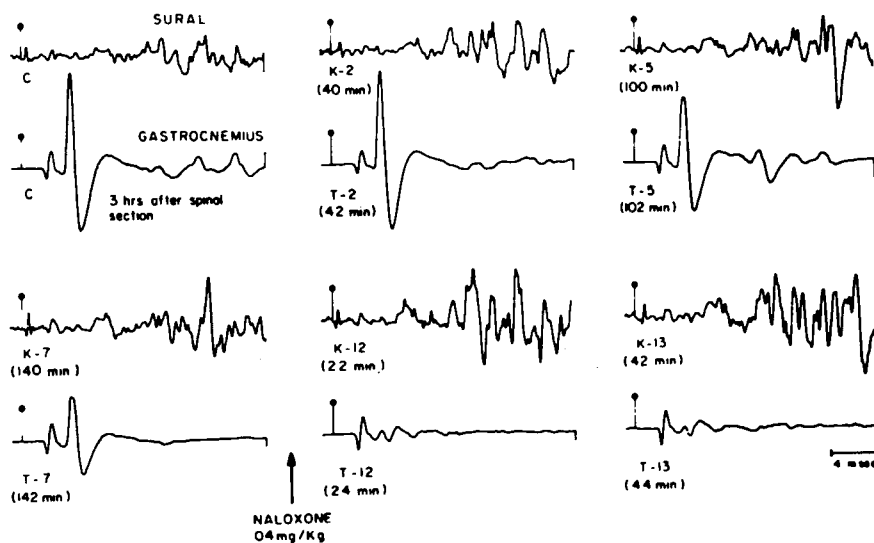


Figura 8. En este experimento se muestra, en el trazo superior, un reflejo polisináptico de larga latencia por estimulación del nervio sural. En el trazo inferior, las respuestas promediadas del nervio gastrocnemio, dos minutos después de cada estimulación tetánica del sural. El reflejo monosináptico va precedido de la salva aferente. A medida que el reflejo polisináptico incrementa su amplitud y el número de sus componentes, el reflejo monosináptico decrece. Ambas tendencias se ven claramente aumentadas por la administración sistemática de una dosis baja de naloxona. El reflejo monosináptico está prácticamente suprimido, sin cambio en la salva aferente (K¹³, T¹³). C, control; Alifleres, artefacto del estímulo eléctrico.

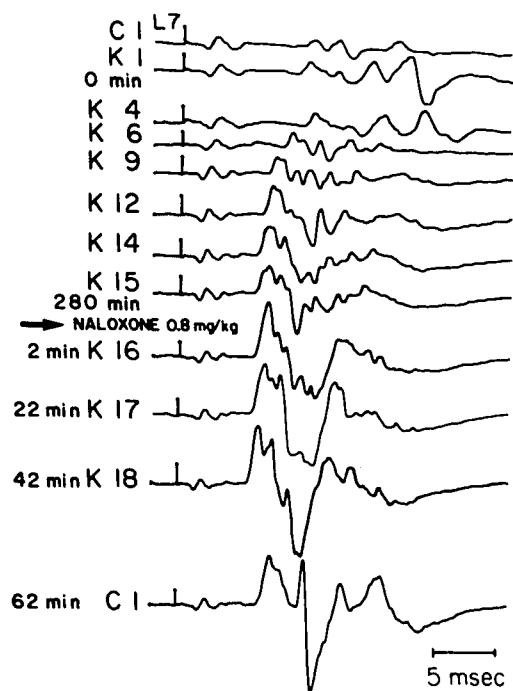


Figura 9. Acortamiento de la latencia e incremento de la amplitud de las respuestas polisinápticas inducidas por estimulación eléctrica del nervio peroneo. Después de 15 ensayos (K¹⁵, 280 min.) de tetanizaciones periódicas, se inyectó una dosis baja de naloxona, continuándose las estimulaciones con un intervalo de 20 min. durante 42 minutos más. Nótese el incremento adicional de la amplitud y el acortamiento de la latencia, provocados por la naloxona. C, control. L7, raíz ventral.

vagotomizados, paralizados (Gallamina) y con respiración artificial. Se practicó una lesión bilateral extensa del tallo cerebral para asegurar la pérdida de la nocicepción. Se disecaron las raíces L6, L7 y S1 para el registro; también se colocaron electrodos sobre el dorso de la médula para detectar la salva aferente. Se vigiló continuamente la presión arterial, la frecuencia cardíaca, y la temperatura (37-38°C).

Los nervios sural, gastrocnemio, peroneo y tibial se disecaron, y se colocaron electrodos bipolares de plata clorurada para su estimulación. Esta, siguiendo el paradigma del *kindling*, consistía en trenes de pulsos rectangulares de 2 meseg, a una frecuencia de 100 Hz, que duraban tres segundos. La intensidad de la corriente varió entre 200 y 400 microamperios. Los ensayos de *kindling* iban precedidos de una búsqueda del umbral de las respuestas de la raíz ventral a choques simples. Los ensayos de *kindling* se hicieron cada 20 minutos (este intervalo está ligeramente por arriba del intervalo mínimo establecido por Goddard en su comunicación original [11]) y comenzaron siempre después de 3-4 horas, cuando el choque espinal había desaparecido. Después de cada estimulación tetanizante se aplicaron 16 choques simples, a

0.2 Hz, al nervio y se promediaron las respuestas de la raíz ventral, los potenciales de campo en las distintas capas de Rexed y la salva aferente. Todos los potenciales, incluyendo el artefacto de estimulación, se grabaron en cinta magnética y también se analizaron y graficaron en tiempo real. Cuando se hacía el *kindling* del nervio sural se registraban, además de las respuestas cutáneas de este nervio, las respuestas monosinápticas del nervio gastrocnemio.

El promedio de los choques simples (0.2 Hz) durante largos periodos reveló una gran constancia de las amplitudes y latencias, así como de la salva aferente.

Los primeros ensayos de *kindling* (K₁-K₃) producían siempre un aumento moderado (alrededor del 20%) de los reflejos mono y polisinápticos, siendo este aumento más notable en los polisinápticos, que (fig 7) alcanzaron su máximo en los ensayos 7-10, seguido de una meseta que duraba por lo menos 3 horas, hasta el último ensayo de *kindling*, usualmente K₁₅. La estimulación tetanizante repetida inducía también cambios en los componentes tardíos de los reflejos. En las respuestas de la raíz ventral a estímulos, aplicados al nervio peroneo, aparecía un componente polisináptico, que crecía progresivamente. En los reflejos aferentes cutáneos polisinápticos que presentan latencias variables, el *kindling* producía sincronización, alargamiento y aumento de la frecuencia de los diversos componentes. Estos cambios, producidos por la tetanización repetida de las aferencias, se propagaban en forma ipsilateral, provocando la aparición de los reflejos en las raíces ventrales adyacentes, previamente silentes. Este fenómeno estaba restringido a las respuestas polisinápticas. Cuando se registraba la raíz ventral contralateral al nervio sural estimulado, no se observaba el efecto de aumento progresivo de las respuestas. Realizamos varios experimentos de tetanización iterativa del nervio sural (aferentes cutáneos), probando la respuesta del nervio gastrocnemio (aferentes musculares), con un retardo de 2 minutos. La figura 8 ilustra el incremento progresivo en amplitud y duración, que ya hemos descrito, de las respuestas polisinápticas cutáneas, acompañado de la disminución, también progresiva de las respuestas monosinápticas del gastrocnemio.

Acción de la atropina y de la naloxona sobre la activación progresiva de los reflejos medulares

La atropina (0.5 mg/Kg) modificaba el *kindling* de la médula espinal, inhibiendo el aumento progresivo de la amplitud y duración de los reflejos mono y polisinápticos. Es más, cuando se alcanzaba previamente un efecto máximo de *kindling*, la atropina producía un efecto de inhibición que alcanzaba su máximo en unos 5 minutos, recuperándose media hora después.

El efecto de la naloxona (0.4 mg/Kg) se caracterizó, principalmente, por un notable aumento de la respuesta máxima del *kindling*, sobre todo de los reflejos polisinápticos. Este aumento de las ya de por sí respuestas aumentadas del *kindling*, continuaba creciendo con los ensayos posteriores de *kindling* y duraba siempre más de 30 minutos (en ocasiones, varias ho-

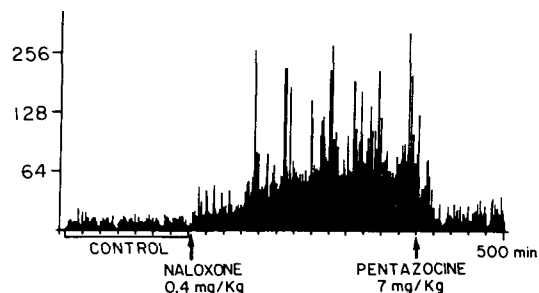


Figura 10. Efecto de la naloxona sola, dosis única de 0.4 mg/Kg. sobre la respuesta multiunitaria de la raíz ventral (S1) a los choques simples (0.2 Hz) al nervio sural. Ordenadas, ciclos por segundo. Abscisas, divididas en intervalos de 20 min. La actividad multiunitaria se registraba durante dos minutos de cada intervalo. Después de 140 minutos de control se inyectó i.v., la naloxona. Nótese el incremento progresivo de la frecuencia de descarga, que alcanza su máximo a los 160 minutos después de la inyección, seguida de una "meseta". La pentazocina (7mg/Kg) revertió el efecto.

ras). La respuesta de las raíces ventrales acortaba su latencia aún más.

Los potenciales de campo (FP), registrados en las láminas de Rexed IV y V, y más profundamente en las láminas VII y IX, mostraron también un aumento gradual y progresivo de las amplitudes, y un acortamiento de las latencias durante el *kindling*, acentuándose ambos fenómenos con la administración de naloxona (fig. 9).

En algunos experimentos ensayamos el efecto de la naloxona sola, sobre las respuestas a 8 choques simples al nervio (0.2 Hz), es decir, sin tetanización, con un intervalo entre las series de estímulos de 20 minutos (fig. 10). La actividad unitaria registrada en la raíz ventral mostró un aumento progresivo y sostenido de la frecuencia de descarga, como consecuencia de una dosis única de naloxona (0.4 mg/Kg, I. V.). Este aumento en la frecuencia de posdescarga permaneció durante 160 minutos, y era revertido inmediatamente por la administración de 7 mg/Kg del agonista morfínico pentazocina.

En experimentos en los que se emplearon frecuencias de estimulación aferente aún más lentas y continuas, se pudo comprobar que aparecía el fenómeno de habituación y deshabitación, y que la naloxona impedía el primero y favorecía el segundo, demostrando así que las endorfinas medulares pueden ser las responsables de la habituación de los reflejos po-

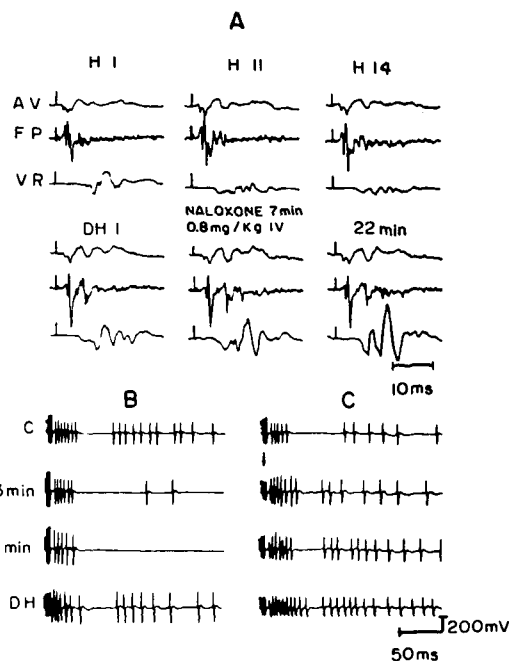


Figura 11. En A se muestra la salva aferente (AV), el potencial de campo (FP) registrado en la lámina V de Rexed, y la respuesta de la raíz ventral (VR), provocados por la estimulación repetida (0.2 Hz) del nervio sural (8 respuestas promediadas). H I, control; H II y H 14, registros a los 55 y 77 minutos después del comienzo de la habituación. DH I muestra la deshabitación que se produce al suspender bruscamente la estimulación. Se reinicia después la habituación, inyectando, a su vez, 0.8 mg/Kg de naloxona i.v. Se muestra la falta de habituación, con un aumento notable de la amplitud de los reflejos, 7 y 22 minutos después de la naloxona. B, muestra la actividad unitaria extracelular de una célula de la capa VI de la médula lumbar, durante el proceso de habituación. C, ilustra el registro de la misma célula, a los mismos intervalos que en B, después de la administración de naloxona (0.8 mg/Kg, flecha). c, control. DH, deshabitación.

lisinápticos (fig 11). En esta misma serie de experimentos (10) se encontraron fibras inmunorreactivas a encefalinas, en estrecha proximidad con las motoneuronas de la lámina IX de Rexed, y con neuronas de las láminas VII y VIII, lo que sugiere una amplia modulación encefalinérgica de las respuestas motoras de la médula espinal.

REFERENCIAS

- BELL JA, MARTIN WR: The effect of the narcotic antagonist naltrexone and nalorphine on spinal cord C-fiber reflexes evoked by electrical stimulation or radiant heat. *Europ J Pharmacol*, 42:147-154, 1977.
- CATLEY DM, CLARKE R W, PASCOE JE: Naloxone enhancement of spinal reflexes in the rabbit. *J Physiol*, 339:61-73, 1983.
- CLARKE RW, GALLOWAY FJ, HARRIS J, TAYLOR JS, FORD TW: Opioidergic inhibition of flexor and extensor reflexes in the rabbit. *J Physiol*, 449: 493-501, 1992.
- CORCORAN ME, WADA JA: Naloxone and the kindling of seizures. *Life Sci*, 24:791-796, 1979.
- FERNANDEZ-GUARDIOLA A, CONDÉS-LARA M, CALVO J M: Synaptic changes induced by optic chiasm low intensity repetitive electrical stimulation: The kindling effect. En: R Tapia, C Cotman (Eds) *Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission*. Plenum Pub Corp, pp 331-334, Nueva York, 1981.
- FERNANDEZ-GUARDIOLA A, CALVO J M, BARRAGAN LA, ALVARADO L, 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*. (Suppl 36):257-263, 1982.
7. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, PELLICER F, CALVO, J M. Sensitization and habituation in cutaneous polysynaptic pathways of the cat spinal cord: Possible role of enkephalinergic processes. En: A. Gorio y cols. (Eds). *Development and Plasticity in Mammalian Spinal Cord*. Springer Verlag, pp 70-71, Berlin 1984.
 8. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, PELLICER F, ROCHA L, GUTIERREZ R: Naloxone facilitates sensory precipitation of focal and generalized seizures. Evoked potentials and power spectra analysis in the cat. *Exper Neurol*, 101:159-175, 1988.
 9. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, ROCHA L, PELLICER F, GUTIERREZ R, CALVO JM: Massed amygdaloid kindling in *encéphale isolé* cats: its facilitation by naloxone. *Epilepsy Res*, 4:55-62, 1989.
 10. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, PELLICER F, LEON-OLEA M, ASAI M, SANCHEZ-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.
 11. GODDARD CV, McINTYRE CD, LEECH CK: A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*, 25:269-330, 1969.
 12. GOLDFARB J, HU JW: Enhancement of reflexes by Naloxone in spinal cats. *Neuropharmacol*, 15:785-792, 1976.
 13. HARDY Ch, PANKSEEP J, ROSSI J, SOLOVIK AJ: Naloxone facilitates amygdaloid kindling in rats. *Brain Res*, 194:293-97, 1980.
 14. HONG JS: Hippocampal opioid peptides and seizures. *Epilepsy Res*, (Suppl 7):18-195, 1992.
 15. HUGHES J, KOSTERLITZ HW, McKNIGHT AT, SOSA RP, LORD AH, WATERFIELD AA: Pharmacological and biochemical aspects of the enkephalins. En: J Hughes (Ed). *Centrally Acting Peptides*. University Park Press. (179-193), Baltimore, 1978.
 16. IADAROLA MJ, SHIN C, McNAMARA JO, YANG HIT: Changes in dynorphin, enkephalin and cholecystoquinin content of hippocampus and substantia nigra after amygdala kindling. *Brain Res*, 365:185-191, 1986.
 17. JACKSON HC, NUTT DJ: Investigation of the involvement of opioid receptors in the action of anticonvulsants. *Psychopharmacology*, 111:486-490, 1993.
 18. KOIDE S, ONISHI H, KATAYAMA M, YAMAGAMI S: Endogenous methionine enkephalin may play an anticonvulsant role in the seizure-susceptible E1 mouse. *Neurochem Res*, 18:1259-1262, 1993.
 19. KOSTERLITZ HW: Endogenous opioid peptides: Historical aspects. En: J Hughes (ed), *Centrally Acting Peptides*. University Park Press, pp 157-159, Baltimore, 1978.
 20. LUJAN M, VALENCIA-FLORES G, RODRIGUEZ R: Electrically induced narcotic-like dependence in the isolated guinea-pig ileum. *Life Sci*, 27:1687-1693, 1980.
 21. NARANJO JR, IADAROLA MJ, COSTA E: Changes in the dynamic state of brain proenkephalin-derived peptides during amygdaloid kindling. *J Neurosci Res*, 16:75-87, 1986.
 22. PELLICER F, ROCHA L, GUTIERREZ R, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Epileptogenesis and hypertonic post-ictal phenomena induced by naloxone in intact cats. *Epilepsia*, 29:374-378, 1988.
 23. ROCHA L, FERNANDEZ-MAS R, GUTIERREZ R, MARTINEZ A, PELLICER F, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Naloxone effects on the visual evoked potentials recorded from the main and accessory visual pathways of the cat. *Prog Neuro-Psychopharmacol and Biol Psychiat*, 15:567-579, 1991.
 24. ROCHA L, ACKERMANN RF, NASSIR Y, CHUGANI HT, ENGEL JJR: Characterization of mu opioid receptor binding during amygdala kindling in rats and effects of chronic naloxone pretreatment: an autoradiographic study. *Epilepsy Res*, 14:195-208, 1993.
 25. RUDOMIN P, DUTTON H: Effects of muscle and cutaneous afferent volleys on excitable fluctuations of 1a terminals. *J Neurophysiol*, 32:158-169, 1969.
 26. THOMAS J, NORES WL, PARISER R: Picrotoxin-induced behavioral tolerance and altered susceptibility to seizures -effects of naloxone. *Pharmacol Biochem & Behavior*, 45:619-622, 1993.
 27. TORTELLA F C, COWAN A: Studies on opioid peptides as endogenous anticonvulsants. *Life Sci*, 31:2225-2228, 1982.
 28. VINDROLA O, BRIONES R, ASSAI M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosci Lett*, 21:39-43, 1981.
 29. WAGNER JJ, TERMAN GW, CHAVKIN C: Endogenous dynorphins inhibit excitatory neurotransmission and block LTP induction in the hippocampus. *Nature*, 363:451-454, 1993.
 30. ZHUO H, FUNG SJ, BARNES CD: Opioid action on spinal cord reflexes due to dorsolateral pontine tegmentum stimulation. *Neuropharmacol*, 32:621-631, 1993.