

Liberación *in vitro* de encefalinas durante la depresión postictal y la actividad interictal

Miguel Asai*

Summary

Opioid peptides effects are proposed to contribute to mechanisms of seizure arrest and refractoriness. Their inhibitory properties have been related to the ictal, postictal and interictal activity. The enkephalins participation during the time-course of a seizure, involve the peptide release from their nervous terminals.

In this work, we studied the *in vitro* release of met-enkephalin from slices of the amygdala in three experimental paradigms: 1) during the postictal depression, 2) after long-term pentylenetetrazol (PTZ) kindled rats and 3) during the interictal activity induced by the infusion of penicillin-G-sodium into the basolateral nucleus of the amygdala.

The experiments were carried out with male Wistar rats, weighing 250-300 g, housed in a light and temperature controlled room (23 + 1 C) with 12 h of illumination starting at 06:00 h. The experimental animals were injected *i.p.* with 30 mg/ of PTZ every 24 h.

The animals were killed by decapitation and the amygdala was dissected. Amygdala was sliced in two directions at 90; at 300 μ m intervals with a tissue chopper. All the experiments were conducted simultaneously using 4 superfusing chambers (two controls and two experimental chambers). Enkephalin release was evoked in the presence of potassium [30 mM] as the depolarizing stimulus and Phe-Ala [1 mM] as a met-enkephalin metabolism inhibitor. The met-enkephalin release was measured by radioimmunoassay procedure.

The results show a significative met-enkephalin increase during the postictal depression and during the interictal activity. These alterations vary depending upon the type of peptide and the brain region studied.

These data support the hypothesis concerning the opioid peptide participation in the mechanisms that underly the postictal depression and interictal activity.

Resumen

Los péptidos opioides han sido propuestos como agentes inhibidores de la aparición, propagación y severidad de una crisis convulsiva. Su posible participación en los procesos epilépticos implica su liberación a partir de las terminales nerviosas que las contienen. El propósito del presente trabajo fue el de estudiar en diversas estructuras del cerebro de la rata, la liberación *in vitro* de encefalinas durante la fase ictal, depresión postictal y actividad interictal.

Los experimentos se hicieron en ratas macho de la cepa wistar, las cuales fueron sometidas al *kindling* químico mediante la administración, por vía intraperitoneal, de una dosis diaria de 30 mg/kg de pentilenetetrazol, y fueron sacrificadas

durante la fase ictal y la depresión postictal. La actividad interictal se estudió al aplicar, en forma crónica, 50 UI de penicilina-G sódica en la amígdala del lóbulo temporal. La concentración de encefalinas se midió por medio de la técnica de radioinmunoensayo.

Los resultados obtenidos muestran que la liberación *in vitro* de encefalinas, provocada por potasio, aumenta significativamente durante la depresión postictal y la actividad interictal. El efecto es de naturaleza selectiva en cuanto a la estructura y el péptido analizado.

Estos datos apoyan la hipótesis concerniente a la participación de las encefalinas en los mecanismos que subyacen en la depresión postictal y la actividad interictal.

Introducción

Actualmente se reconoce que la actividad convulsiva provoca la activación del sistema encefalinérgico, el cual se deriva de 3 prohormonas hasta ahora identificadas, la proencefalina A (PA), la prodinorfina (PDNF) y la proopiomelanocortina (POMC). El procesamiento postraducciona a nivel de aminoácidos básicos ha permitido identificar y caracterizar a más de 20 péptidos con potente actividad opioide. A este grupo creciente de péptidos se les denominó genéricamente como endorfinas. En el presente trabajo se hace particular énfasis en 2 pentapéptidos pertenecientes a este grupo, conocidos como Metionina-encefalina y Leucina-encefalina.

Numerosos estudios han demostrado que la actividad epiléptica producida por diferentes modelos experimentales, aumenta la concentración tisular de encefalinas (12,14,16,33,38,39,40), el de sus precursores y el de los RNAm que codifican para la elaboración de PA y PDNF (23). Estos cambios son selectivos en cuanto a la estructura y péptido analizado (15, 26) y pueden durar por lo menos 15 días (1, 33,40).

Los péptidos opioides han sido propuestos como agentes inhibidores de la actividad epiléptica. Diversos grupos de investigación han sugerido que las encefalinas prolongan el período refractario y contribuyen a detener la actividad epiléptica (3,4,5,9,11,21, 25,29). También se ha postulado que disminuyen la severidad de una crisis convulsiva (32) y aumentan el umbral convulsivo (6). La interacción de los péptidos opioides y su receptor, ha sido interpretada como un mecanismo tendiente a limitar las convulsiones (2,35). El *kindling* eléctrico aumenta la unión de los ligandos opiáceos por los receptores μ en el SNC (31).

* Laboratorio de Análisis Químicos. División de Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco 14370, México, D.F.

Varios grupos de investigación han señalado que las encefalinas se liberan después de una crisis epiléptica tanto en los animales (17,36) como en los seres humanos (19); así, una vez liberados, los opioides podrían intervenir en los procesos que subyacen a la depresión postictal y en las alteraciones conductuales interictales (3,34).

Si la actividad epiléptica produce cambios en el sistema encefalinérgico y la presencia de péptidos opioides se puede asociar con reacciones de tipo homeostático que contribuyan a mantener el estado interictal, así como a limitar la propagación de la crisis o a restringir la descarga ictal, es necesario estudiar la liberación de péptidos opioides, principalmente en el momento en el que se les adjudica su participación fisiopatológica.

El propósito del presente trabajo es el de mostrar los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, en los estudios sobre la liberación *in vitro* de encefalinas durante la fase ictal y la depresión postictal en animales sometidos al *kindling* químico con pentilnetetrazol (PTZ), así como los datos obtenidos al estudiar la actividad interictal producida por la administración de penicilina-G en la amígdala del lóbulo temporal de la rata.

Estudios de liberación *in vitro*

Material y Métodos

Los animales utilizados fueron ratas macho de la cepa wistar (250-250 g), mantenidos en condiciones de luz y oscuridad controlada. El alimento y el agua fueron suministrados *ad libitum*. Las ratas fueron so-

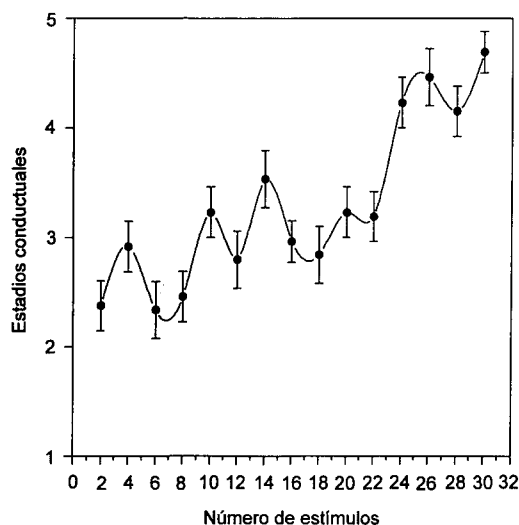


Figura 1. A un grupo de 100 ratas macho de la cepa wistar se le inyectó diariamente una dosis de 30 mg/kg de pentilnetetrazol (PTZ) por vía intraperitoneal. La inyección se aplicó entre las 11-12:00 a.m. (n = 100 + S.E.M.).

metidas al *kindling* químico con PTZ, administrando una dosis diaria de 35 mg/kg, y los estadios conductuales fueron calificados de acuerdo con los parámetros descritos por Ito y col. (18) (fig. 1). Se utilizaron sólo aquellas ratas que presentaron 3 veces el estadio 5 (crisis generalizadas tónico-clónicas). Se separó el cerebro rápidamente, y la amígdala se disecó y se cortó en rebanadas de 300 μ m. Se provocó la liberación de encefalinas por la presencia de potasio a una concentración de 30 mM. Se utilizaron 4 cámaras de perfusión continua, 2 cámaras control y 2 experimentales (simultáneamente). Los perfusados se inactivaron por ebullición en b.m. durante 15 min. Las muestras se congelaron a -20 C hasta la determinación posterior de encefalinas.

Para caracterizar la preparación de la liberación en condiciones *in vitro*, (fig. 2), se hicieron 3 experimentos adicionales que consistieron en a) evaluar la liberación provocada por K⁺; b) en presencia/ausencia de Ca²⁺; c) en presencia/ausencia del inhibidor de la encefalinasa, el dipéptido Phe-Ala [1 mM] cuyo efecto protector se ha descrito previamente (42).

Cuantificación de encefalinas

La cuantificación de encefalinas se hizo mediante la técnica de radioinmunoanálisis, utilizando anticuerpos obtenidos previamente en nuestro laboratorio. La purificación preparatoria de las muestras, así como el método de obtención, caracterización y reactividad cruzada de nuestros anticuerpos se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos descritos en estudios previos de nuestro laboratorio (28,38).

1) Liberación de IR-Met-encefalina durante la fase ictal y depresión postictal.

Con el propósito de analizar la liberación *in vitro* de las encefalinas durante la fase ictal y la depresión

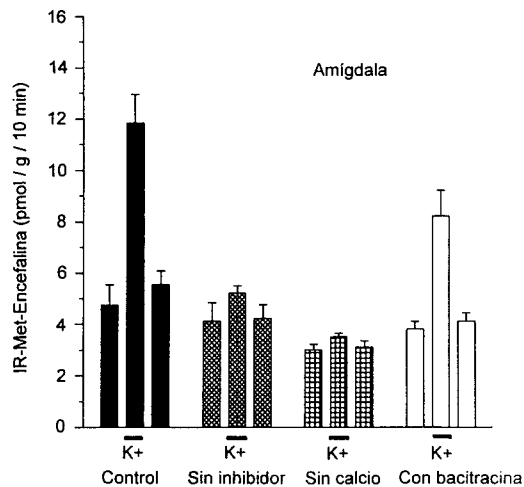


Figura 2. La figura muestra los experimentos que se hicieron para caracterizar la liberación *in vitro* de IR-Met-encefalina (El control contiene Phe-Ala [1mM] y calcio [2.5 mM], bacitracina [30 μ g/ml].(n = 3 + S.E.M.).

postictal, se sacrificó un primer grupo de animales sometidos al *kindling* con PTZ, 15 segundos después de haber iniciado la fase ictal. Los grupos subsiguientes se sacrificaron a los 2, 5, y 10 min después de finalizar la fase ictal.

TABLA 1
Cruzamientos de los anticuerpos
contra Met- y Leu-encefalina

Péptido	Porcentaje de cruzamiento	
	ME	LE
Met- (o) -encefalina	100.00	< 0.01
Met-encefalina	2.90	3.83
Leu-encefalina	0.01	100.00
Met-encefalina-Arg	0.76	0.53
Leu-encefalina-Arg	< 0.01	4.33
Met-encefalina-Arg-Phe	< 0.01	0.37
Met-encefalina-Arg-Gly-Leu	< 0.01	< 0.01
Dinorfina (1-8)	< 0.01	< 0.01
Alfa-endorfina	< 0.01	< 0.01
Beta-endorfina	< 0.01	< 0.01
Gamma-endorfina	< 0.01	< 0.01

Los resultados muestran que la liberación provocada de encefalinas por la presencia de potasio, no se modifica durante la fase ictal con respecto a su control; el aumento de la liberación se inicia a los 2 min y alcanza un valor significativamente mayor, 5 min después del final de la crisis. Después de transcurridos 10 min, la liberación de IR-ME tiende a recuperar su valor control (fig. 3). Estos datos son congruentes con la hipótesis señalada por Vélisek y Mare (37), quienes proponen que el sistema encefalinérgico se activa entre los 5 y los 10 min posteriores al término de la postdescarga inducida por la estimulación eléctrica del hipocampo y con las propuestas iniciales que sugerían un aumento en la liberación de opioides durante la depresión postictal (11,22).

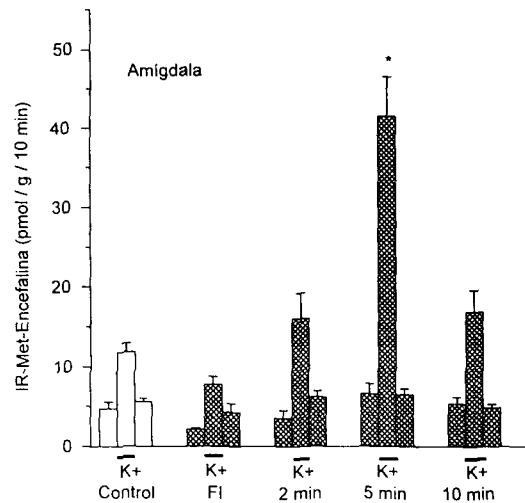


Figura 3. La figura muestra la liberación *in vitro* de IR-Met-encefalina, provocada por potasio [30 mM], durante la fase ictal (FI) y durante la depresión postictal (2, 5, 10 min después de finalizada la crisis). La significancia se calculó con la prueba "t" de Student. * $p < 0.001$ con respecto al grupo control ($n = 5 \pm$ S.E.M.).

trica del hipocampo y con las propuestas iniciales que sugerían un aumento en la liberación de opioides durante la depresión postictal (11,22).

2) Liberación de IR-Met-encefalina durante los estudios de larga duración

En estudios anteriores reportamos que el *kindling* químico y eléctrico, produce un aumento en la concentración tisular de encefalinas por un periodo de 15

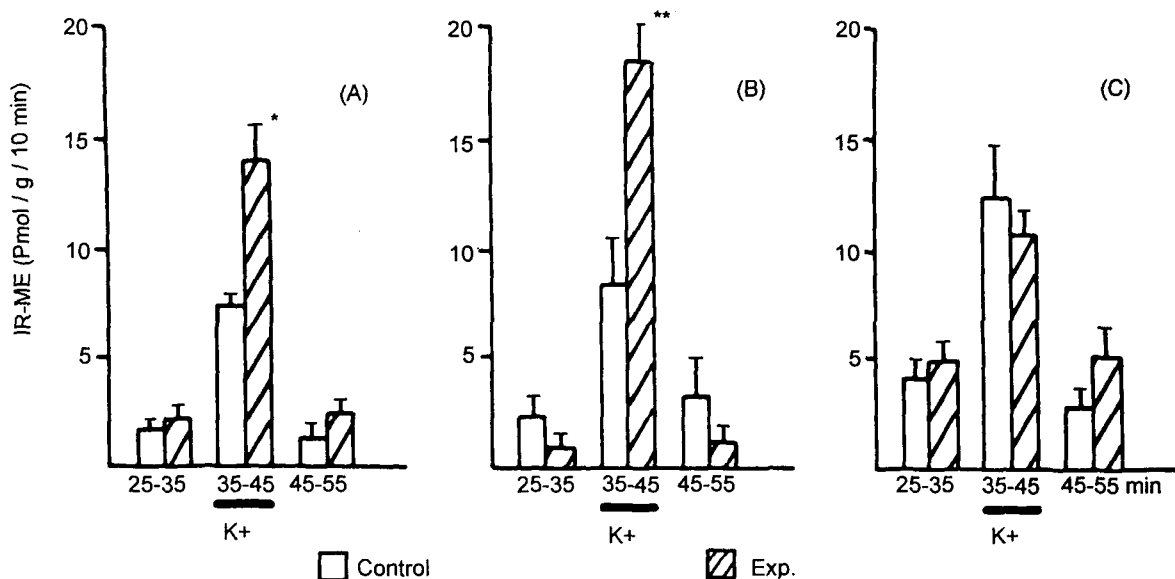


Figura 4. La figura muestra la liberación *in vitro* de IR-Met-encefalina provocada por potasio [30 mM] en los estudios de larga duración. Las ratas sometidas al *kindling* químico con PTZ fueron sacrificadas A) 1 día, B) 15 días, y C) 30 días después del último estímulo con PTZ. La significancia se calculó con la prueba "t" de Student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto a su control ($n = 7 \pm$ S.E.M.).

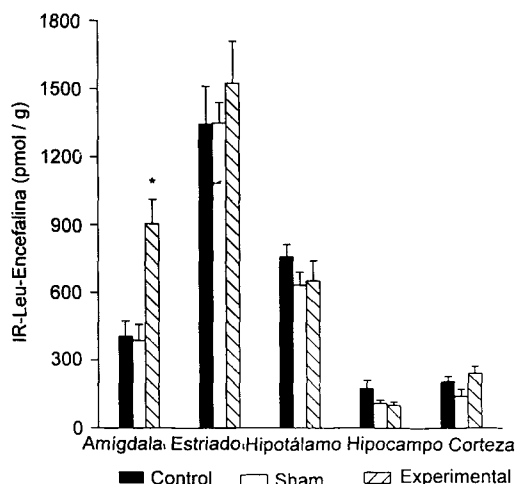


Figura 5. La figura muestra el contenido de IR-Met-encefalina en diferentes estructuras del cerebro de las ratas, sacrificadas 5 días después de administrarles en la amígdala del lóbulo temporal, una dosis de 50 UI de penicilina-G disuelta en 1 μ l de agua pH 7.0. La significancia se calculó con la prueba "t" de Student * $p < 0.002$ con respecto al control ($n = 10 \pm$ S.E.M.).

días (1,33,40). El aumento en el contenido de encefalinas, como producto final de su metabolismo, también se acompaña de evidencias que muestran que el sistema encefalinérgico se activa desde que aumenta la concentración de sus precursores, la PA y PDNF, así como el de sus respectivos RNAm. Estos cambios se manifiestan al utilizar diversos modelos experimentales, como el *kindling* eléctrico (23), el choque electroconvulsivo (41) y la administración intraestriatal de ácido kaínico (20). El aumento global de las encefali-

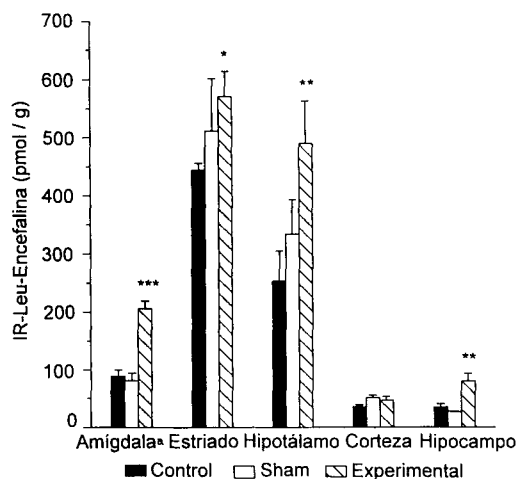


Figura 6. La figura muestra el contenido de IR-Leu-encefalina. Las condiciones son iguales a las descritas en la figura 5. * $p < 0.02$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto a su control ($n = 10 \pm$ S.E.M.).

nas y de sus precursores nos permitió sugerir que su liberación también estaría aumentada.

El propósito de los siguientes experimentos fue el de examinar la probable existencia, en la amígdala del lóbulo temporal de la rata sometida al *kindling* químico con PTZ, de un correlato entre el valor de la concentración tisular de Met-encefalina y su liberación, al sacrificar a los animales 1, 15 y 30 días después de la última estimulación con PTZ.

La figura 4 muestra que la liberación *in vitro* de IR-Met-encefalina se mantiene aumentada después de 1 y 15 días (así como su contenido tisular), para recuperar valores semejantes al control 30 días después de la última estimulación, momento en el cual su concentración en el tejido tiende a ser similar al grupo control.

3) Liberación de encefalinas durante la actividad interictal.

Las espigas interictales han estado asociadas con un aumento en los efectos inhibitorios de la actividad epiléptica (7,24,30). Sin embargo, se desconocen los mecanismos básicos que subyacen a la actividad interictal. Los estudios iniciales realizados por los grupos de Frenk, (11) y Engel (9), utilizando el *kindling* eléctrico amigdalino, mostraron que la administración previa de morfina aumenta la depresión postictal e incrementa la frecuencia de las espigas interictales; ambos efectos se revirtieron en presencia de la naloxona (antagonista opiáceo), lo cual sugiere la presencia de los péptidos opiodes. Es necesario recordar que la fase ictal y la depresión postictal tienen una temporalidad de minutos, sin embargo, la actividad interictal (All) puede durar semanas o meses. En todo este tiempo y sin presentarse crisis generalizadas ¿cómo podría activarse el sistema opiode?

Una posible explicación sería que la actividad producida por la sola presencia de las espigas interictales representa un estímulo suficiente para modificar el contenido de las encefalinas y su liberación. Decidimos estudiar esta hipótesis usando penicilina-G como un modelo que reprodujera la actividad interictal.

La administración tópica de penicilina-G se ha utilizado frecuentemente como un agente que produce All. Estas descargas son similares a las registradas en la corteza cerebral de los seres humanos (10). Las interneuronas que rodean el foco penicilínico muestran actividad inhibitoria, probablemente como un mecanismo homeostático que contribuye a restringir la propagación de la actividad convulsiva (30).

La aplicación tópica de penicilina-G durante 5 días, en la amígdala del lóbulo temporal de la rata (50 UI disueltas en 1 μ l de agua pH 7.4), mostró 2 resultados: a) un incremento significativo en el contenido de encefalinas en la amígdala (figs. 5,6), y b) un correlato paralelo con su liberación, ya que la actividad repetida de las espigas interictales produjo un aumento significativo en la liberación *in vitro* de ambas encefalinas (figs. 7,8).

Resulta interesante notar que desde la aparición de la espigas interictales producidas por la administración de dosis bajas de penicilina-G, hasta la genera-

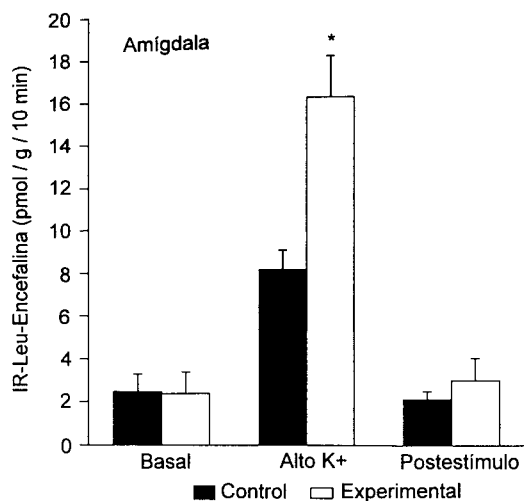


Figura 7. La figura muestra la liberación in vitro de IR-ME durante la actividad interictal producida por la administración diaria, durante 5 días, de 50 UI de penicilina-G disuelta en 1 μ l pH 7.0 en la amígdala del lóbulo temporal. La significancia se calculó con la prueba "t" de student * $p < 0.05$ con respecto a su control ($n = 5 \pm$ S.E.M.).

ción de procesos que desencadenan cambios permanentes en la excitabilidad neuronal, como los producidos por el *kindling* eléctrico, son capaces de modificar en forma rápida y duradera a todo el sistema encefalínérgico.

Estas alteraciones pueden poner en marcha mecanismos compensatorios que aumenten la biosíntesis y el recambio de los péptidos opioides, acordes con la velocidad y con el tiempo que pueden requerir. Esta propiedad podría encontrar un nivel de respuesta, si integramos a la relación estímulo-transcripción, la participación de un cierto tipo de genes denominados *Immediate-Early Genes* (IEG).

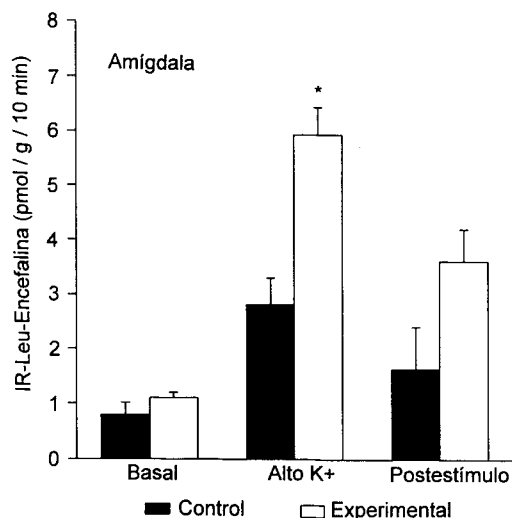


Figura 8. La figura muestra la liberación de IR-Leu-encefalina. Las condiciones son iguales a las descritas en la figura 7. * $p < 0.006$ con respecto a su control ($n=5 \pm$ S.E.M.).

Como consecuencia de la actividad epiléptica, los receptores del tipo NMDA aceptan calcio en el interior de la célula. Este catión activa el sistema de segundos mensajeros, como el AMPc, el dicacil-glicerol y la calmodulina (principal aceptor de calcio en las células no musculares). La relación calcio-segundos mensajeros puede activar factores de transcripción involucrados en la transcripción de los IEG (8). Se ha demostrado que la actividad epiléptica activa a los IEG, los cuales generan un incremento en el contenido del RNAm que codifica para la PA y, por tanto, aumentan la concentración tisular de opioides (27). El efecto es específico para determinadas regiones del hipocampo y se mantiene por espacio de 2 semanas (13). Si bien la aparición de crisis generalizadas tónico-clónicas incrementa significativamente el contenido de encefalinas, el de sus precursores y sus respectivos RNA mensajeros, es probable que durante el tiempo que transcurre hasta la aparición de una nueva crisis, las espigas interictales generen un valor tónico en la concentración y liberación de opioides, los cuales puedan contribuir a mantener el estado interictal.

Conclusiones

Los datos presentados pueden contribuir a reforzar la hipótesis de la participación de los péptidos opioides durante la depresión postictal y la actividad interictal. Es evidente que se requiere de un mayor esfuerzo para integrar el papel fisiológico que desempeñan los más de 20 péptidos opioides identificados en las diferentes poblaciones neuronales del SNC. Hasta el momento, prácticamente se ignora cuál es la participación de los péptidos derivados de la prodinorfina, los cuales, paradójicamente, poseen una mayor potencia opioide cuando se les compara con las encefalinas.

El creciente número de evidencias que muestran la coexistencia de diferentes neurotransmisores con los neuropéptidos, sin soslayar la presencia de múltiples receptores a opioides ampliamente distribuidos en todo el sistema nervioso central, si bien aumentan la complejidad del sistema, por otro lado pueden ser propiedades que ayuden a explicar los procesos epilépticos.

Durante los últimos años hemos asistido a una enorme explosión de datos provenientes de los neuropéptidos, los cuales, aunados a los encontrados sobre las moléculas con una influencia decisiva en los procesos epilépticos como el GABA y el ácido glutámico, los factores tróficos y las determinantes genéticas, deberán integrarse al esquema fisiopatológico de las alteraciones epilépticas con el fin de diseñar agentes anticonvulsivantes de mayor especificidad que sean capaces de mantener un estado interictal y de evitar la aparición, propagación y severidad de una crisis convulsiva.

Agradecimientos

Los experimentos y registros electroencefalográficos derivados de la actividad interictal fueron llevados a cabo con la

participación del doctor Augusto Fernández-Guardiola, a quien el autor agradece cumplidamente su ayuda, colaboración y orientación en la realización de estos experimentos. También a los biólogos, Adrián Martínez y Gilberto Matamo-

ros, por su valiosa ayuda para la realización de este trabajo, y al señor Raúl Cardoso por el material de ilustración. Trabajo apoyado por el CONACyT, clave 0779-N9110 a M.A. y 0694-N91109 a A.F.G.

REFERENCIAS

1. ASAI M, VINDROLA O, ZUBIETA M, TALAVERA E, MASSARINI A: Diurnal variations of IR-Met-enkephalin in the rat brain of pentylenetetrazol-kindled rats. *Brain Res*, 442:101-107, 1988.
2. BOHME G A, STUTZMANN J M, ROQUES B P, BLANCHARD J C: Effects of selective mu- and delta-opioid peptides on kindled amygdaloid seizures in rats. *Neurosci Lett*, 74:227-231, 1987.
3. CALDECOTT-HAZARD S, ENGEL J Jr: Limbic postictal events anatomical substrates and opioid receptor involvement. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 11:389-418, 1987.
4. COTTRELL G A, BOHUS B: Immediate and long-term effects of opiate antagonists on postictal behavior following amygdala kindling in the rat. *Eur J Pharmacol*, 141:417-421, 1987.
5. COTTRELL G A, NYAKAS C, BOHUS B: Hippocampal kindling-induced after-discharge and behavioral depression: immediate and long-term attenuation by opiate antagonist. *Eur J Pharmacol*, 150:1-8, 1988.
6. COWAN A, GELLER E B, ADLER M W: Classification of opioids on the basis of change in seizure threshold in rats. *Science*, 206:465-467, 1979.
7. DICHTER M, SPENCER W A: Penicillin-induced interictal discharges from cat hippocampus. Characteristics and topographical features. *J Neurophysiol*, 32:649-662, 1969.
8. DRAGUNOW R W, CURRIE R L, FAULL L M, ROBERTSON H A, JANSEN K: Immediate-early genes, kindling and long-term potentiation. *Neurosci and Biobehav Rev*, 13:301-313, 1989.
9. ENGEL J Jr., ACKERMANN R: Interictal EEG spikes correlate with decreased, rather than increased, epileptogenicity in amygdaloid kindled rats. *Brain Res*, 190:543-548, 1980.
10. FISHER R S: Animals models of the epilepsies. *Brain Res Rev*, 14:245-278, 1989.
11. FRENK H, ENGEL J Jr, ACKERMANN R, SHAVIT Y, LIEBESKIND J C: Endogenous opioids may mediate post-ictal behavioral depression in amygdaloid-kindled rats. *Brain Res*, 167:435-440, 1979.
12. GALL C: Seizures induce dramatic and distinctly different changes in enkephalin, dynorphin and CCK immunoreactivities in mouse hippocampal mossy fibers. *J Neurosci*, 8:1852-1862, 1988.
13. GALL C, WHITE J: Studies of the expression of opioid peptides and their respective mRNAs in hippocampal seizure. En: Chan-Palay Y, Kohler C, (Eds). *The Hippocampus-New Vistas*, Alan Liss, pp. 153-170, Nueva York, 1989.
14. HONG JS, GILLIN JC, YANG HYT COSTA E: Repeated electroconvulsive shocks and the brain content of endorphins. *Brain Res*, 177:273-278, 1979.
15. HONG JS: Hippocampal opioid peptides and seizures. *Epilepsy Res*, (Suppl 7):187-195, 1992.
16. IADAROLA MJ, SHIN C, McNAMARA JO, YANG HYT: Changes in dynorphin, enkephalin and cholecystokinin content of hippocampus and substantia nigra after amygdala kindling. *Brain Res*, 365:185-195, 1986.
17. IADAROLA MJ, FLORES CM, CHANG HYT: Release of Met⁵-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷-Leu⁸ immunoreactivity into rat cerebrospinal fluid by electroconvulsive shock. *Biochem Pharmacol*, 80:421-425, 1987.
18. ITO T, HORI M, YOSHIDA K, SHIMUZU M: Effect of anticonvulsants on seizure developing in the course of daily administration of pentylenetetrazol to rats. *Eur J Pharmacol*, 45:165-172, 1977.
19. JIANGUO C, XUEKONG X: A study on opioid peptides in CSF of patients with epilepsy. *Epilepsy Res*, 6:141-145, 1990.
20. KANAMATSU T, OBIE J, GRIMES L, McGINTY JF, YOSHIKAWA K, SABOL S, HONG JS: Kainic acid alters the metabolism of met⁵-enkephalin and the level of dynorphin A in the rat hippocampus. *Neurosci*, 6:3094-3102, 1986.
21. KELSEY JE, BELLUZI JD: Endorphin mediation of postictal effects of kindled seizures in rats. *Brain Res*, 253:337-340, 1982.
22. LEE PHK, ZHAO D, XIE C W, McGINTY JF, MITCHELL CL, HONG JS: Changes of proenkephalin and prodynorphin mRNAs and related peptides in rat brain during the development of deep prepyriform cortex kindling. *Mol Brain Res*, 6:263-273, 1989.
23. LEBOVITZ R: Autorhythmicity of spontaneous interictal spike discharge at hippocampal penicillin foci. *Brain Res*, 172:35-55, 1979.
24. MUCHA RF, PINEL JP: Postseizure inhibition of kindled seizure. *Exp. Neurol*, 54:266-282, 1977.
25. McGINTY JF, KANAMATSU T, OBIE J, DYER RS, MITCHELL C L, HONG J S: Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity but decreases dynorphin-A-like immunoreactivity in rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 71:31-36, 1986.
26. MORGAN JI, CURRAN T: Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. *Trends Pharmacol*, 12:343-349, 1991.
27. PELLICER F, ASAI M, LEON-OLEA M, SANCHEZ-ALVAREZ M: *In vitro* release of IR-Met- and IR-Leu-enkephalins in whole periesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Com Biochem Physiol*, 104(c):323-325, 1993.
28. POST RM, PUTMAN F, CONTEL NR, GOLDMAN B: Electroconvulsive seizures inhibit amygdala kindling: implications for mechanisms of action in affective illness. *Epilepsia*, 25:234-239, 1984.
29. PRINCE DA, WILDER BJ: Control mechanisms in cortical epileptogenic foci. *Arch Neurol*, 16:194-202, 1967.
30. ROCHA L, ACKERMANN R, NASSIR Y, CHUGANI HT, ENGEL J Jr: Characterization of mu opioid receptor binding during amygdala kindling in rats and effects of chronic naloxone pretreatment: an autoradiographic study. *Epilepsy Res*, 1993, (en prensa).
31. SCHWARK WS, FREY HH, CZUCZWAR SJ: Effect of opiates on the parameters of seizures in rats with full amygdaloid-kindled convulsions. *Neuropharmacology*, 25:839-844, 1986.
32. TALAVERA E, OMAÑA-MAGAÑA I, ASAI M, CONDESLARA M: Regional brain IR-Met and IR-Leu-enkephalin concentrations during progress and full electrical amygdaloid kindling. *Brain Res*, 485:141-148, 1989.
33. TORTELLA FC, ECHEVARRIA E, ROBLES, MOSBERG HI, HOLADAY JW: Anticonvulsant effects of mu (DAGO) and delta (DPDPE) enkephalins in rats. *Peptides*, 9:1177-1181, 1988.
34. THOMAS J, NORES WL, PARISER R: Picrotoxin-induced behavioral tolerance and altered susceptibility to seizures-effects of naloxone. *Pharmacol Biochem Behav*, 45:3-13, 1993.
35. VELISEK L, MARE P: Differential effects of naloxone on postictal depression. *Epilepsy Res*, 12:37-43, 1992.
36. TORTELLA FC, LONG JB: Characterization of opioid peptide-like anticonvulsant activity in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res*, 456:139-146, 1988.
37. VINDROLA O, BRIONES R, ASAI M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Amygdaloid kindling enhances the en-

- kephalin content in the rat brain. *Neurosci Lett*, 21:39-43, 1981.
38. VINDROLA O, BRIONES R, ASAI M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Brain content of Leu⁵- and Met⁵-enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat. *Neurosci Lett*, 26:125-130, 1981.
 39. VINDROLA O, ASAI M, ZUBIETA M, TALAVERA E, RODRIGUEZ E, LINARES G: Pentylentetrazol kindling induces a long-lasting elevation of IR-Met-enkephalin but not IR-Leu-enkephalin in rat brain. *Brain Res*, 297:121-126, 1984.
 40. YOSHIKAWA K, HONG JS, SABOL SL: Electroconvulsive shock increases preproenkephalin messenger RNA abundance in rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:489-593, 1985.
 41. ZUBIETA M, VINDROLA O, TALAVERA E, ASAI M, MASSARINI A, LINARES G: Pentylentetrazol-induced seizure produce an increases release of IR-Met-enkephalin from rat striatum *in vitro*. *Brain Res*, 360:101-107, 1985.