

Activación del sistema de los opiodes endógenos por dosis subconvulsivantes de metrazol

Luisa Rocha*^{***}
Magdalena Briones*
Agustina Cano*
Carlos Cruz**
Imelda Omaña*
Rafael Villalobos^{***}

Summary

For the present study, the changes induced on opioid peptide system in the rat brain by a subconvulsant amount of metrazol (PTZ) (30 mg/kg i.p.) were investigated.

Using a microdialysis procedure we found a significant opioid peptide release in hippocampus and amygdala, during the early 60 min. following administration. Thereafter, the values returned to basal conditions. By autoradiography experiments, we observed a significant decrease of mu receptor binding in different brain areas. Ligand binding analysis in membranes showed decreased number of receptors without changes in their affinity. Randall-Sellito test indicated increased threshold to nociceptive stimulus, during the early 30 min after PTZ administration. Finally, *in situ* hybridization procedure revealed increased levels of proenkephalin expression 24 h following PTZ.

Our results suggest that a subconvulsant amount of PTZ is able to activate opioid peptide system. These changes are relevant for the understanding the epileptogenesis process and mechanisms associated.

Key words: Opioids, metrazol, epilepsy, mu receptors, proenkephalin, release.

Resumen

Se investigaron las alteraciones en el sistema de los opiodes endógenos en el cerebro de la rata, inducidas por la administración de una dosis subconvulsivante de metrazol (PTZ) (30 mg/kg i.p.).

Por medio de experimentos de microdiálisis, encontramos durante los primeros 60 min después del tratamiento, una liberación importante de opiodes endógenos en el hipocampo y la amígdala cerebral. Posteriormente, los valores regresaron a los niveles basales. Por autorradiografía se observó un decremento en los niveles de los receptores mu en varias estructuras cerebrales. Mediante el análisis de la unión a receptor en las membranas cerebrales, se confirmó un decremento en el número de estos receptores, sin cambios en sus afinidad. En la aplicación de la prueba de Randall-Sellito, se en-

contró un aumento en el umbral de respuesta a estímulos dolorosos, durante los primeros 30 min después del PTZ. Finalmente, experimentos de hibridación *in situ* revelaron un incremento en los niveles de la proencefalina a las 24 hrs después del tratamiento.

Nuestros resultados indican que la administración de dosis subconvulsivantes de PTZ activan de manera importante al sistema de los opiodes endógenos. Estos cambios resultan relevantes para entender el proceso de epileptogénesis y los mecanismos involucrados en el mismo.

Palabras clave: Opiodes, metrazol, epilepsia, receptores mu, proencefalina, liberación.

Introducción

El *kindling* químico es un modelo experimental de la epilepsia, que consiste en la administración repetida de dosis subconvulsivantes de sustancias excitatorias como es el metrazol (PTZ), el cual de manera progresiva induce cambios electrográficos y conductuales progresivos que culminan en una actividad epiléptica generalizada (Mason y cols., 1972). Se desconocen los mecanismos por los que se incrementa progresivamente la susceptibilidad al PTZ. Es posible que los efectos de los mecanismos inhibitorios disminuyan o aumenten los excitadores (Mody, 1993).

El sistema de los aminoácidos excitadores está implicado en la inducción de crisis generalizadas por PTZ. Estudios previos han demostrado que los niveles de glutamato están elevados en el líquido cefalorraquídeo de las ratas con crisis generalizadas clónico-tónicas producidas por PTZ (Halonen y cols., 1992). En un estudio previo describimos que una dosis subconvulsivante de PTZ aumenta la liberación de glutamato y aspartato en la corteza frontal y en la amígdala (Rocha y cols., 1996b).

El sistema GABAérgico y el de los opiodes endógenos son sistemas inhibidores involucrados en los efectos epileptógenos que resultan del PTZ. Previamente describimos que la administración única y repetida de

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

** División de Estudios Clínicos, IMP.

*** Unidad de Terapéutica Experimental, CINVESTAV-IPN.

dosis subconvulsivantes de PTZ da como resultado una disminución significativa de los niveles de los receptores a benzodiazepinas, que forman parte del complejo del receptor GABAérgico, en áreas específicas del cerebro de la rata (Rocha y cols., 1996a).

Existen evidencias que indican que el sistema de los opioides endógenos se activa como resultado del desarrollo del *kindling* químico por PTZ. Sin embargo, hasta el momento únicamente se han evaluado cambios conductuales y de los niveles tisulares de estos péptidos en animales que presentan crisis epilépticas generalizadas (Vindrola y cols., 1983; Barati y cols., 1990).

El presente estudio tuvo como propósito evaluar el efecto de una dosis subconvulsivante de PTZ en la liberación y síntesis de los opioides endógenos, cambios en sus receptores de tipo μ y un posible efecto analgésico que resulte de dicha activación.

Material y método

a) Animales y tratamientos

Se utilizaron ratas macho Wistar de un peso de 300-350 gr. Los animales se colocaron en cajas separadas con un ciclo de luz-oscuridad 12:12, y acceso *ad libitum* a comida y agua.

El PTZ (Sigma, St. Louis, MO.) se disolvió en una solución salina. Se administró a una concentración de 30 mg/kg i.p., en un volumen de 1 ml/kg. Los animales controles recibieron una inyección de solución salina (1 ml/kg, i.p.). Durante los primeros 30 min después del tratamiento se observaron cambios conductuales, los cuales se clasificaron de acuerdo a la escala descrita por Ito y cols. (1977): fase I, sin movimientos; fase II, mioclonias de cabeza; fase III, mioclonias de cuerpo; fase IV, postura de canguro y mioclonias del cuerpo; fase V, pérdida de la postura y crisis generalizadas.

b) Microdiálisis para opioides endógenos

Las ratas se anestesiaron con una combinación de ketamina (100 mg/kg i.p.) y xilazina (20 mg/kg i.m.). Posteriormente, una guía para cánula de microdiálisis se implantó encima de la amígdala cerebral (A-2.5; L+4.5; V+7.5) o del hipocampo (A-5.2; L+5.0; V+3.5), de acuerdo a las coordenadas establecidas en el atlas Paxinos y cols. (1986). Tornillos de acero inoxidable se implantaron en el cráneo sobre las cortezas cerebral y cerebelar. Las guías y los tornillos se fijaron al cráneo con acrílico dental. Se dejó un tiempo de recuperación de 7 días después de la cirugía.

Veinticuatro horas antes de realizar los experimentos de microdiálisis, los animales se colocaron en un recipiente de policarbonato con libre acceso a comida y agua. Los animales se anestesiaron con halotano en O_2/N_2O (1:1), y una cánula para microdiálisis se insertó a través de la guía. Por medio de una bomba de perfusión Harvard (modelo 55-2222) las cánulas de microdiálisis se perfundieron continuamente con líquido cefalorraquídeo artificial (NaCl, 125 mM; KCl, 2.5 mM; NaH_2PO_4 , 0.5 mM; Na_2HPO_4 , 5 mM; $CaCl_2$, 1.2 mM; $MgCl_2$, 1 mM; ácido ascórbico 0.2 mM; albúmina de

suero bovino, 0.025%) 2.7 μ l/min, a un pH de 7.4 y previamente esterilizado. Las cánulas se fijaron a la guía con acrílico dental. Las cánulas para microdiálisis se construyeron de acuerdo a lo descrito por Maidment y cols. (1989) y su parte activa consistió en una membrana de poliacrilonitrilo (Hospal) de 3 mm de largo. Se dejó un tiempo de recuperación de 2 hrs después del implante de las cánulas. Previamente al tratamiento y en condiciones basales, se colectaron perfusados a intervalos de 30 min durante 3 h. Posteriormente, se administró el PTZ o la solución salina. Posteriormente, se continuó con la recolección continua de los perfusados, cada 30 min por 5 hrs. Las muestras de perfusado se congelaron a $-80^\circ C$ hasta el día en que se realizaron los experimentos de radioinmunoensayo y HPLC. Para más detalles acerca de estos últimos procedimientos, consultar el trabajo de Maidment y cols. (1989).

c) Autorradiografía para receptores μ

Los animales recibieron una inyección de PTZ o de solución salina, y 24 hrs después se sacrificaron por decapitación. Los cerebros se congelaron rápidamente en hielo seco. Secciones coronales de 20 μ m de grosor colocadas en laminillas cubiertas con gelatina se incubaron durante 60 min a $25^\circ C$ en una solución conteniendo 2 nM de 3H-DAMGO (que es un agonista μ de los opioides endógenos), en una solución amortiguadora de Tris HCl 50 mM, en ausencia o presencia de 1 μ M de levorfanol (un agonista μ). La incubación se concluyó con 2 lavados sucesivos en solución Tris HCl 50 mM (1 min cada uno) (pH 7.5, $4^\circ C$). Las secciones se secaron rápidamente con aire frío y se colocaron en magazines de plomo para radiografía junto con estándares de tritio. Posteriormente se pusieron en contacto con una película sensible al tritio (Amersham), y 10 semanas después se procesaron con revelador Kodak (D 19) y fijador rápido. Las distintas regiones del cerebro se identificaron con base en el atlas de la rata de Paxinos y Watson (1986). La densidad óptica (OD) de los autorradiogramas se determinó utilizando un programa de análisis de imágenes (JAVA, Jandel Software del Análisis del Video). Las lecturas de OD de los estándares se utilizaron para determinar los valores de la radioactividad del tejido de las laminillas adyacentes. La OD se convirtió en fmol/mg tejido con base en los estándares de tritio.

d) Determinación de receptores μ en membranas

Las ratas recibieron una administración de PTZ o de solución salina, y 24 hrs después se sacrificaron por decapitación. Su cerebro se obtuvo sobre una superficie fría en la cual se disecaron la amígdala cerebral, la corteza cerebral, el estriado e hipocampo, según el método de Glovinski e Iversen (1966). El tejido se colocó dentro de tubos de polipropileno y se procedió a obtener las membranas, siguiendo el procedimiento descrito por Gletier (1989). Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951) y cada una de las muestras se diluyó en solución amortiguadora Tris, hasta obtener una concentración de 50 mg de proteína por ml.

Las membranas (2.5 mg) se incubaron por una hora a 25 °C con el radioligando (³H-DAMGO, agonista mu de los opioides endógenos) a concentraciones crecientes (de 0.01 nM a 10 nM) en presencia o ausencia del ligando frío (naloxona, antagonista de los receptores mu y delta). Cada concentración se realizó por triplicado. La incubación finalizó con el filtrado de las membranas en un "Harvest Cell". Los filtros se depositaron en viales y se procedió a determinar las cuentas por minuto durante 5 min de cada muestra en un contador de centelleo (Gletier y cols., 1989). La cantidad de receptores y su afinidad se determinó por medio del programa "EBDA" (McPherson, 1988).

e) Hibridación in situ

Los animales experimentales se sacrificaron por decapitación a las 24 hrs después de haber recibido i.p. una dosis de PTZ o solución salina y sus cerebros se congelaron en hielo seco. Rebanadas de 20 um de grosor a nivel del hipocampo dorsal se fijaron con paraformaldehído al 4%. Se expusieron a una mezcla de prehibridación a 42 °C, durante 1 hr, y posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 12 hrs, con una mezcla que contenía una sonda marcada con S³⁵ que hibridiza específicamente la porción del ARNm de la proencefalina de la rata (Cimino y cols., 1991). Las rebanadas se lavaron por una serie de baños. Se secaron con aire frío y se expusieron a películas sensibles al azufre marcado en magazines de rayos-X, durante 6 semanas. Por último, las imágenes que resultaron, se analizaron con un sistema de computación especial para el análisis de imágenes (JAVA software).

f) Evaluación de la respuesta al dolor

Se utilizó la prueba de Randall-Sellito (RST) para evaluar las respuestas a los estímulos nociceptivos. Se utilizaron dos grupos de animales, uno de control y el otro experimental durante 3 días seguidos. Durante el primer día, los animales de ambos grupos fueron manipulados pero no recibieron tratamiento. En el segundo día, ambos grupos recibieron una inyección de solución salina (1 ml/kg, i.p.). En el tercero, el grupo control recibió una inyección de solución salina (1 ml/kg, i.p.), mientras que el grupo experimental recibió una dosis de PTZ. Durante cada día, a los 30 min después de la manipulación o de la administración de PTZ o solución salina, se aplicó la prueba de Randall-Sellito, la cual consistió en aplicar presión en una pata posterior, cuya intensidad se incrementó progresivamente. El umbral al dolor para cada animal fue una presión en grs suficiente para que presentaran un reflejo en el que retiraban la pata o chillaban.

g) Análisis histológico

El sitio de implante de la cánula de microdiálisis se verificó en secciones corónales (20 um) de cada cerebro por medio de la tinción de violeta de cresilo y por examinación en un microscopio de luz.

Resultados

a) Cambios conductuales por la administración de PTZ

La administración de dosis subconvulsivantes de PTZ produjo cambios conductuales correspondientes a la fase II en 80 % de los animales y a la fase III en el 20 %.

b) Microdiálisis para opioides endógenos

La administración de PTZ durante los experimentos de microdiálisis aumentó la liberación de los opioides endógenos en la amígdala cerebral (100 %) e hipocampo (180 %). Estos cambios fueron significativos de los 90 a 120 min después de la inyección. Posteriormente, los valores regresaron a sus niveles basales (figura 1).

La identificación de la inmunorreactividad a péptidos opioides llevada a cabo por los experimentos de HPLC, mostró que la inyección de PTZ incrementa la liberación de Met- y Leu-encefalina en la amígdala cerebral, y de Met- y Leu-encefalina así como Dinorfina-A (1-6) y Dinorfina-A (1-8) en el hipocampo.

c) Evaluación de los receptores mu

La administración de una dosis subconvulsivante de PTZ dio como resultado una reducción de los niveles de los receptores mu en la corteza parietal (30 %), piriforme (27 %), entorrinal (27 %), así como en los núcleos basolateral (33 %) y cortical (32 %) del complejo amigdalino (figura 2).

Con base en los experimentos de receptores en membranas se detectó que el decremento de los receptores mu se debió a una disminución en el número de los mismos, sin que hubieran alteraciones en sus afinidades (cuadro 1).

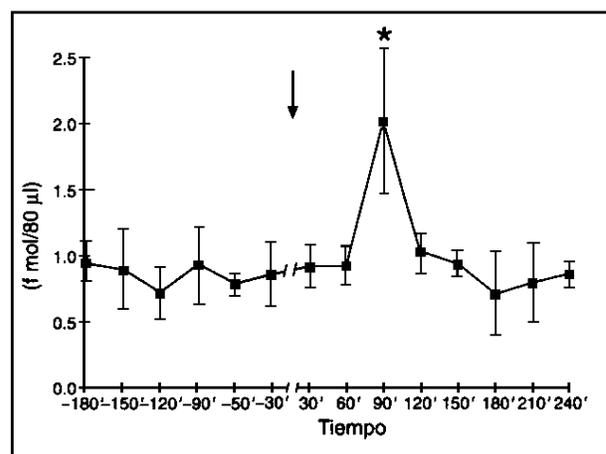


Figura 1. Cambios en la liberación de opioides endógenos en la amígdala cerebral inducida por la administración de una dosis de PTZ (30 mg/kg, i.p.) durante los experimentos de microdiálisis. La flecha indica el momento de administración del PTZ. Los valores representan el promedio ± error estándar de 6 animales. *p < 0.05 en comparación con los valores basales. La significancia se obtuvo aplicando una prueba de ANOVA seguida de una prueba T-Student pareada.

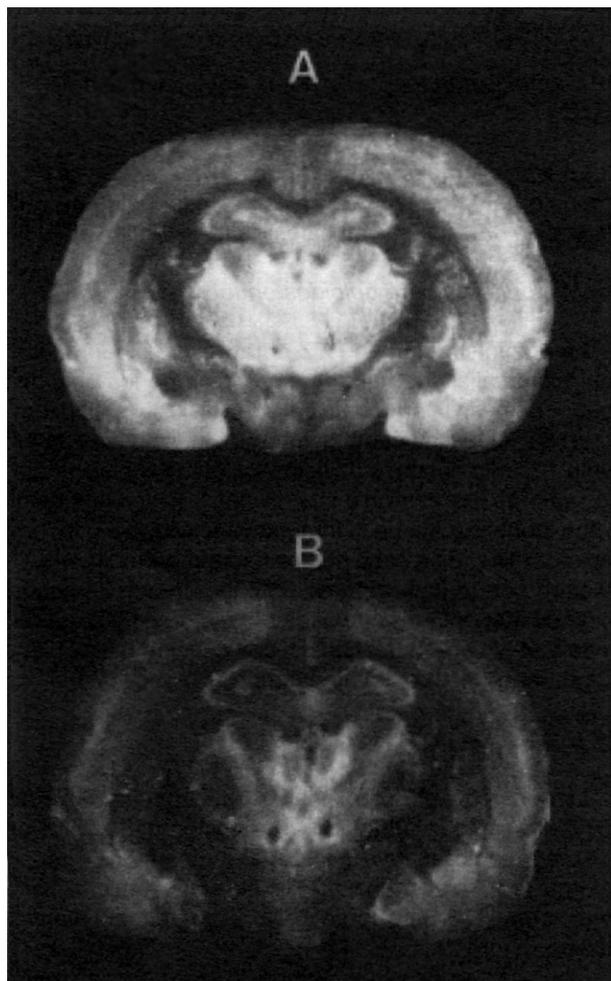


Figura 2. Autorradiogramas que muestran la distribución de receptores mu marcados con [3H]DAGO (5 nM) en secciones coronales a nivel del complejo amigdalino e hipocampo dorsal. La intensidad del color blanco es proporcional a la densidad de receptores mu. En comparación con la sección obtenida de una rata control (A), la sección de una rata tratada con una dosis subconvulsivante de PTZ (B) muestra menor densidad de receptores mu en diferentes estructuras cerebrales.

d) Hibridación para proencefalina

Los experimentos de hibridación en el cerebro de animales tratados con PTZ y sacrificados 24 hrs después

de la inyección, mostraron que la expresión de proencefalina se incrementa significativamente al nivel del giro dentado (27 %) y en áreas CA1-3 (147 %) del hipocampo, en la amígdala cerebral (68 %), en la corteza del cíngulo (60 %), en la entorrinal (100 %) y en la piriforme (93%) (figura 3).

e) Evaluación de la respuesta al dolor

La prueba de Randall-Sellito no mostró diferencias significativas en el umbral al dolor de ambos grupos, cuando se les aplicó después de la manipulación y sin tratamiento posterior a la administración de solución salina. En contraste, se observó un aumento en el umbral al dolor (27 %, $p < 0.01$) cuando dicha prueba se aplicó a los 30 min después de suministrar PTZ, en comparación con los animales que recibieron solución salina (figura 4).

Discusión

Se sabe que la administración de PTZ a dosis de 10 a 20 mg/kg, induce crisis epilépticas de corta duración (15 seg) (Marescaux y cols., 1984), mientras que la inyección a dosis mayores resultan en crisis generalizadas crónico-tónicas (Swinyard y cols., 1969). En el presente estudio, se evaluó el efecto de la administración de 30 mg/kg de PTZ, dosis que por cierto induce mioclonías de cuerpo (fase II) en el 80 % de los sujetos experimentales.

Evidencias experimentales indican que el PTZ activa el sistema de los opioides endógenos (Tortella y cols., 1985; Vindrola y cols. 1981, 1983), el cual juega un papel importante en la supresión de la actividad epiléptica (Post y cols. 1984). Vindrola y cols. (1983) encontraron que el *kindling* químico se asocia con un incremento significativo de los niveles de los opioides endógenos en diferentes estructuras cerebrales. La administración de PTZ produce cambios en la memoria, los cuales se revierten con naloxona, un antagonista de los opioides endógenos (Barati y cols. 1990).

En el presente trabajo encontramos que la administración sistémica de dosis subconvulsivantes de PTZ se asocia a una respuesta analgésica durante los primeros minutos después del tratamiento. Estos cambios

CUADRO 1
Efecto de la administración de una dosis subconvulsivante de PTZ en la unión de [3H]DAMGO a receptores mu en membranas de áreas cerebrales específicas.

Núcleo	Afinidad Kd (nM)		No. receptores B _{max} (pmol/gr de tejido)	
	Control	PTZ	Control	PTZ
Amígdala	1.75 ± 0.10	1.60 ± 0.15	4.30 ± 0.3	2.29 ± 0.25*
Corteza	1.60 ± 0.20	2.00 ± 1.20	3.07 ± 0.2	1.13 ± 0.15*
Estriado	2.20 ± 0.40	1.80 ± 0.90	3.10 ± 0.4	2.97 ± 0.33
Hipocampo	0.60 ± 0.02	0.70 ± 0.01	2.93 ± 0.4	3.05 ± 0.25

* Cada valor representa el promedio ± error estándar de 6 experimentos. Las diferencias significativas se calcularon usando la prueba T-student. *p < 0.05 en comparación con los valores del grupo control.

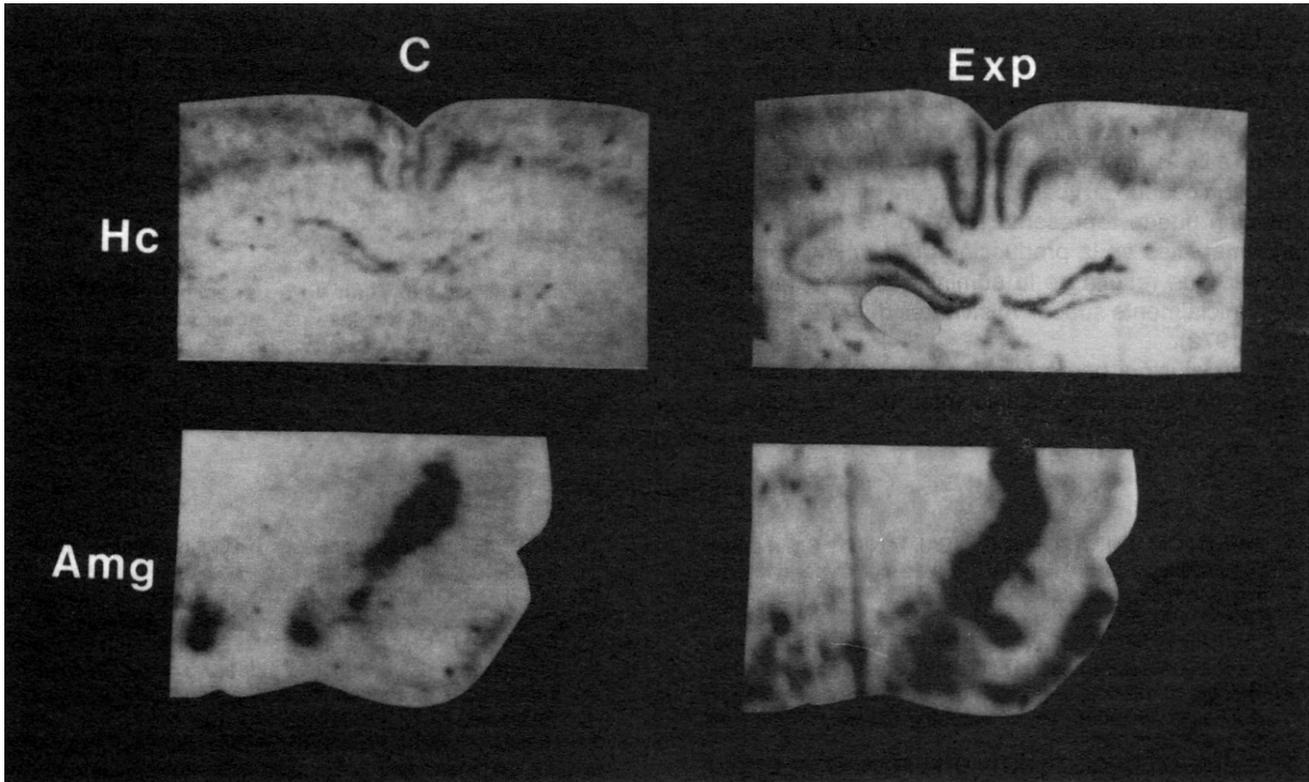


Figura 3. Imágenes de hibridación para proencefalina a nivel del hipocampo dorsal (HC) y amígdala cerebral (Amg) obtenidas de un animal tratado con solución salina (C) y de un animal tratado con una dosis subconvulsivante de PTZ (Exp). Nótese que en el animal Exp, la expresión de proencefalina es mayor, tanto en el hipocampo como en la amígdala cerebral, que en el animal C.

pueden ser el resultado del aumento de la liberación de opioides endógenos en la amígdala cerebral e hipocampo de ratas en libre movimiento, que detectamos por medio de nuestros experimentos de microdiálisis.

Por otra parte, se encontró que el tratamiento con PTZ aumenta los niveles de la proencefalina, que es el precursor de la Met- y Leu-encefalina. Es posible sugerir que este efecto refleja un aumento en la síntesis de las

encefalinas como mecanismo compensatorio que resulta del aumento de la liberación de estos péptidos.

La exposición crónica a los agonistas de los opioides endógenos puede inducir un decremento de los niveles de sus receptores (Steece y cols., 1989). En el presente estudio llama la atención que la exposición a una dosis única y subconvulsivante de PTZ produce un decremento importante en los niveles de dichos receptores en diferentes estructuras cerebrales, cambios que dependen de su número. Dichas alteraciones pueden asociarse con un decremento de los efectos inhibidores que resultan de la acción de los opioides sobre sus receptores, con un subsecuente deterioro en su efecto inhibitor.

Es posible que la liberación de opioides endógenos inducida después de la administración de PTZ medie la internalización de los receptores, con la subsecuente degradación de los mismos. Un efecto similar se ha reportado después de la administración de agonistas de los opioides endógenos (Evans y cols., en preparación).

Por lo que concierne a la interacción entre los opioides endógenos y otros neurotransmisores, se sabe que los ácidos excitadores estimulan la liberación *in vitro* de Met-encefalina en rebanadas de estriado y del globo pálido de la rata (Ruzicka y cols., 1991). El incremento en la liberación de glutamato, detectado después de la administración de dosis subconvulsivantes de PTZ encontrado en experimentos de microdiálisis (Rocha y cols., 1996b), puede ser un mecanismo que explique el aumento de la liberación de los opioides endógenos y el subsecuente decremento de sus receptores mu.

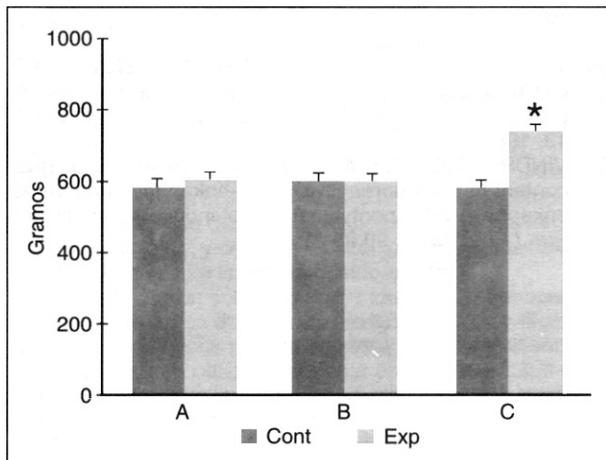


Figura 4. Valores obtenidos con la prueba de Randall-Selitto 30 min después de la manipulación de los animales sin tratamiento (A) la administración de solución salina en ambos grupos (B) y de solución salina y PTZ (C) en los grupos control (barras negras) y experimental (barras con diagonales), respectivamente. Los valores mostrados representan el promedio \pm error estándar del umbral al dolor (grs) de 6 animales. * $p < 0.01$ de acuerdo a la aplicación de una prueba T-Student.

Las alteraciones en la liberación y síntesis de los opioides endógenos, así como las de sus receptores detectados en nuestros experimentos no son permanentes. Sin embargo, estos cambios pueden asociarse a una mayor susceptibilidad a la actividad epiléptica debido a la disminución del sitio de acción de estos péptidos, aun cuando su liberación esté incrementada. Esta situación puede representar uno de los mecanismos fundamentales en la producción del *kindling* químico, proceso que resulta de la administración repetida de dosis inicialmente subconvulsivantes de PTZ (Mason y cols., 1972).

En conclusión, hemos demostrado que la administración de dosis subconvulsivantes de PTZ activa al

sistema de los opioides endógenos. Estas evidencias sugieren la importancia de evaluar las consecuencias del proceso de epileptogénesis desde su inicio, así como el de los sucesos epilépticos no convulsivantes.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Feliciano Camacho y a Raúl Cardoso por su excelente asistencia. El presente estudio fue realizado con apoyo del CONACYT (proyecto 3918-N9402) y del Instituto Mexicano de Psiquiatría (proyecto 3280).

REFERENCIAS

1. BARATI CM, EURASQUIN GA, FAIMAN CP: Brain opioid peptides may participate in the reversal of pentylene-tetrazol-induced amnesia. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*, 12:451-456, 1990.
2. CIMINO M, ZOH M, WEISS B: Differential ontogenic expression and regulation of proenkephalin and preprosomatostatin mRNAs in rat caudate-putamen as studied by in situ hybridization histochemistry. *Develop Brain Res*, 60:115-122, 1991.
3. GLEITER C, DECKER, NUTT D, MARANGOS P: Electroconvulsive shock (ECS) and the adenosine neuromodulatory systems effect of single and repeated ECS on the adenosine A1 and A2 receptors, adenylate cyclase, and the adenosine uptake site. *J Neurochem*, 52:641-646, 1989.
4. GLOWINSKI J, IVERSEN LL: Regional studies of catecholamines in the rat brain.-I. *J Neurochem*, 13:655-699, 1966.
5. HALONEN T, PITKANEN A, PARTANEN J, HYTTINEN J M, RIEKKINEN P J: Amino-acid levels in cerebrospinal fluid of rats after administration of pentylene-tetrazol. *Comp Biochem. Physiol.* 101: 21-25, 1992.
6. ITO T, HORI M, YOSHIDA K, SHIMUSU M: Effect of anticonvulsant on seizure developing in the course of daily administration of pentetrazol to rats. *Eur J Pharmacol*, 45:165-172, 1977.
7. LOWRY OH, ROSENBROUGH NA, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265, 1951.
8. MAIDMENT NT, BRUMBAUGH DR, RUDOLPH VD, ERDELYI E, EVANS CJ: Microdialysis of extracellular endogenous opioid peptides from rat brain in vivo. *Neuroscience*, 33:549-557, 1989.
9. MASON CR, COOPER RM: A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentylene-tetrazol. *Epilepsia*, 13:663-674, 1972.
10. MCPHERSON GA: Analysis of radioligand binding experiments: a collection of computer programs for the IBM PC. *J Pharmacol Methods*, 14:213-228, 1985.
11. MODY I: The Molecular Basis of Kindling. *Brain Pathology*, 3:395-403, 1993.
12. PAXINOS G, WATSON C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, Londres, 1986.
13. 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.
14. ROCHA L, ACKERMAN RF, ENGEL JJr: Chronic and single administration of pentylene-tetrazol modifies benzodiazepine receptor binding: an autoradiography study. *Epilepsy Res*, 24:65-72, 1996a.
15. ROCHA L, BRIONES M, ACKERMAN RF, ANTON B, MAIDMENT NT, EVANS CJ, ENGEL JJr: Pentylene-tetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems. *Epilepsy Res*, 26:105-113, 1996b.
16. RUZICKA BB, JHAMADAS K: Met-enkephalin release from slices of the rat striatum and globus pallidus: stimulation by excitatory amino acids. *J Pharmacol Exp Ther*, 257:1025-1033, 1991.
17. STEECE KA, LEE JM, FIELDS JZ, DELEON-JONES FA, RITZMAN RF: Differential down-regulation of delta opioid binding sites during physical dependence on methionine enkephalin in the rat. *Life Sci*, 44:1449-1455, 1989.
18. SWINYARD EA: Laboratory evaluation of antiepileptic drugs. Review of laboratory methods. *Epilepsia*, 10:107-119, 1969.
19. TORTELLA FC, LONG JB: Endogenous anticonvulsant substance in rat cerebrospinal fluid after a generalized seizure. *Science*, 228:1106-1108, 1985.
20. VINDROLA O, BRIONES R, ASAI M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosci Lett*, 21:39-43, 1981.
21. VINDROLA O, ASAI A, ZUBIETA M, LINARES G: Brain content of immunoreactive Leu-5-enkephalin and Met-5-enkephalin after pentylene-tetrazol-induced convulsions. *Eur J Pharmacol*, 90:85-89, 1983.