

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO, GCH
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE ENCEFALINAS EN LA HIPOFISIS Y EL ENCEFALO DEL AXOLOTL (*Ambystoma mexicanum*) DURANTE LA METAMORFOSIS INDUCIDA CON TIROXINA (T4).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA,
EN EL AREA DE NEUROCIENCIAS
P R E S E N T A:
LA BIOL. AGUSTINA CANO MARTINEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA

MEXICO, D. F. 1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

	Paginas
INDICE GENERAL	1-2
1.0 INTRODUCCION	3-4
2.0 ANFIBIOS	
2.1 Biología de los Anfibios	5
Origen y Evolución de los Anfibios	5-6
El Ciclo de Vida de los Anfibios	6
Especificaciones sobre sus Características	6-11
Casos Especiales	11-12
Biología de <u>Ambystoma mexicanum</u>	12-14
2.2 Metamorfosis	14
Cambios Morfo-Fisiológicos	14-15
Cambios Bioquímico-Fisiológicos	16-17
Cambios Conductuales y de Hábitos Alimenticios ..	17-18
Factores que Determinan la Metamorfosis en los Anfibios	18
Interacciones Hipotálamo-Hipofisiarias	18
Glándula Tiroides	19-20
Integración Hormonal de la Metamorfosis en los Anfibios Anuros (Modelo de Etkin)	20-21
Metamorfosis en Anfibios Urodelos	21-22
Metamorfosis en <u>Ambystoma mexicanum</u>	22
2.3 Grados de Neotenia en los Anfibios	22-23
Neotenia Evolutiva	23-24
3.0 ENCEFALINAS	
3.1 Encefalinas en los Mamíferos	24-25
3.2 Posibles Implicaciones Fisiológicas de las Encefalinas	26-27
3.3 Encefalinas en los Anfibios	27-28

3.4	<i>Encefalinas en otros Vertebrados e Invertebrados</i>	28-29
4.0	ANTECEDENTES INMEDIATOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29-31
5.0	HIPOTESIS	32
6.0	MATERIAL Y METODOS	
	Material Biológico	32
	Metamorfosis T4-Inducida	32-33
	Obtención de los Tejidos	33-34
	Purificación de Encefalinas	34
	Obtención de Antisueros Anti-ENKs	34
	Iodación de Encefalinas	34-35
	Cuantificación de Encefalinas	35-36
	Cuantificación de Triiodotironina (T3)	36
7.0	RESULTADOS	
	Cambios Fenotípicos y Conductuales	36
	Parámetros Morfométricos	36-37
	Niveles Circulantes de T3	37
	Concentración de Encefalinas	37-38
8.0	DISCUSION	38-39
	Metamorfosis: Criterios Morfométricos	39
	Metamorfosis y Tironinas	40-41
	Metamorfosis y Encefalinas en la unidad Hipotálamo-hipófisis	41-43
	Cambios Cerebrales Extrahipotalámicos	43-45
9.	APENDICE:	
	Anexo I: Colonia de <u>A. mexicanum</u>	48-52
	Anexo II: Inducción de Metamorfosis en <u>A. mexicanum</u>	53-57
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	58-72

Abreviaturas

A. - Ambystoma

AACD = ancho aleta caudo-dorsal
AAD = ancho aleta dorsal
AAV = ancho aleta ventral
ACHT = hormona adrenocorticotrópica
ADH = hormona antidiurética
AVT = arginina vasotocina
Cm = control de manipulación
C1 = control inicial, sin metamorfosis
ENKs = encefalinas
Fig. = figura
FLC = factor liberador de la corticotropina
FSH = hormona foliculo estimulante
g = gramo
GH = hormona del crecimineto
HE = heptapéptido (ME-Arg-Phe)
H-H = hipotálamo-hipófisis
HPLC = cromatografía líquido de alta presión
HT = hormonas tiroideas
IHQ = inmunohistoquímica
IIBM = Instituto de Investigaciones Biomédicas
ip = intraperitoneal
IR = inmunoreactividad
LBR = longitud de branquias
LE = leucina-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)
LH = hormona luteinizante
LT = longitud total
ME = metionina-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met)
ml = mililitro
m.a = millones de años
MSH = hormona estimulante de los melanocitos
N = normal (concentración)
OC = octapéptido (ME-Arg-Gly-Leu)
OXT = oxitocina
PRL = prolactina
PEF = proencefalina
PDNF = prodinorfina
pmol = picomol
POMC = proopiomelanocortina
REF. = referencias
RIA = radioinmunoanálisis
rpm = revoluciones por minuto
SNC = sistema nervioso central
T4 = tiroxina-tetraiodotironina (hormona tiroidea)
TEC. = técnica
T3 = triiodotironina (hormona tiroidea)
TRH = hormona liberadora de la tirotropina
TSH = hormona estimulante de las hormonas tiroideas
U = unidad (concentración, dosis)
VIP = péptido intestinal vasoactivo
VSP = vasopresina

1.0 INTRODUCCION

En estudios previos demostramos la presencia de inmunoreactividad (IR) para Met-Encefalina (ME) y Leu-Encefalina (LE) en hipófisis y encéfalo de dos anfibios urodelos; Ambystoma mexicanum (11, 29) y Ambystoma tigrinum (30). Al igual que en reptiles, (100) en estos anfibios la concentración cerebral de encefalinas es relativamente mayor que en el cerebro de mamíferos y su distribución exhibe una clara regionalización. Además en A. tigrinum, que presenta metamorfosis espontánea, observamos que la concentración encefálica e hipofisiaria de encefalinas difiere de manera significativa entre organismos metamorfoseados y sin metamorfosis (30).

Estos resultados aunados a la relativa sencillez del sistema nervioso de A. mexicanum, nos llevaron a considerar el estudio de este anfibio, desde diferentes puntos de vista. En particular, estos primeros hallazgos planteaban la interrogante de cuál podría ser el significado de tales neuropéptidos en la fisiología de A. mexicanum y otros anfibios.

La mayoría de los anfibios tienen un ciclo de vida que incluye dos procesos generales de desarrollo: la embriogénesis y la metamorfosis. Después del desarrollo embrionario se presenta una fase larvaria que al igual que la fase embrionaria es acuática, y al presentar metamorfosis da lugar a la forma adulta terrestre. Se considera que las transformaciones estructurales, fisiológicas, bioquímicas y conductuales que caracterizan a la metamorfosis permitirán que los organismos se adapten al nuevo habitat (17, 39, 46, 57).

La metamorfosis en los anfibios depende de mecanismos endocrinos, en los que participan las dos hormonas tiroideas bioactivas (tiroxina, T4 y triiodotironina, T3); así como las hormonas hipofisiarias: tirotropina (TSH) y prolactina (PRL) dependientes de la regulación hipotalámica (52, 53, 88).

A. mexicanum presenta una estrategia de desarrollo especial, conocida con el nombre de neotenia. Este proceso se caracteriza por la maduración de la actividad reproductiva en organismos que retienen su morfología y hábitos larvarios. Así, paradójicamente, en los organismos neoténicos, la regulación neuroendocrina es funcional para la reproducción; mientras que la metamorfosis permanece inhibida (46, 88).

Desde el punto de vista experimental, esta especie, representa un excelente modelo para realizar estudios sobre la metamorfosis. A. mexicanum es una especie neoténica obligada inducible, que a diferencia de la mayoría de los anfibios, no presenta metamorfosis espontánea; sin embargo, es capaz de presentar metamorfosis bajo la administración experimental de hormonas tiroideas o TSH (17, 46, 88). Así, es posible controlar y sincronizar el momento de inicio de la metamorfosis en todos los organismos experimentales, analizar el desarrollo temporal del proceso e identificar las diferentes etapas de la metamorfosis.

Sobre estas bases la presente tesis se diseñó con el

propósito de cuantificar la concentración de encefalinas en diferentes estructuras encefálicas y en la glándula hipófisis de A. mexicanum durante las etapas de la metamorfosis inducida con T4.

El análisis de estos mensajeros químicos en diferentes condiciones fisiológicas, como en el caso de las etapas de la metamorfosis, podría proporcionar información importante sobre el papel que las encefalinas juegan en la fisiología de los anfibios.

Para alcanzar el objetivo central de la tesis fue necesario cubrir otros dos objetivos particulares:

a) Contar con una población suficiente de A. mexicanum bajo condiciones controladas, lo cual se logró mediante el establecimiento de una colonia de A. mexicanum en condiciones de laboratorio. La formación de la colonia se enmarca en los objetivos globales de un proyecto de investigación sobre la biología del desarrollo y las encefalinas en esta especie, llevado a cabo en la institución donde se realizó el trabajo de tesis. (Apéndice, anexo I).

b) Contar con un método para la inducción de metamorfosis en A. mexicanum y reconocer sus etapas. En el caso de anfibios urodelos no existen métodos precisos para la inducción de metamorfosis, tampoco para la definición de sus etapas (90). Fue necesario evaluar la dosis, vía y frecuencia de administración de T4 con el objeto de encontrar las condiciones óptimas de estimulación de metamorfosis en A. mexicanum a la vez que permitiera reconocer las etapas del proceso mediante criterios morfométricos (Apéndice, anexo II).

En base a lo anterior, en el cuerpo central de la tesis se presenta, hasta donde sabemos, el primer estudio en A. mexicanum acerca de los cambios en la concentración de las encefalinas en el sistema nervioso central (SNC) y la glándula hipófisis a lo largo de la metamorfosis.

Con el propósito de ubicar la presente investigación en un contexto biológico y fisiológico, la tesis se divide en las siguientes grandes secciones. En la primera se revisan los aspectos más relevantes sobre la biología de los anfibios anuros y urodelos, con especial atención en A. mexicanum, así como en los procesos de metamorfosis y neotenia. En una segunda parte se hace una revisión de la información disponible acerca de las encefalinas en el SNC de diferentes especies animales, en particular en los anfibios. En la tercera sección se describen los objetivos, hipótesis y desarrollo del presente estudio. A continuación se presenta una sección que describe y discute los resultados obtenidos. En seguida se presenta el apéndice con sus anexos correspondientes y por último se anotan las referencias bibliográficas.

2.0 ANFIBIOS

2.1. Biología de los Anfibios

Los anfibios son vertebrados poiquiloterms (temperatura interna variable). Generalmente presentan piel lisa y sin escamas, con circulación doble pero incompleta y corazón dividido en 3 cavidades. La respiración es pulmonar en el adulto, aunque existen algunas excepciones. Ponen huevos carentes de las membranas amniótica y alantoidea, es decir son anamniotas. En la mayoría de los casos a partir de los huevos fecundados se desarrollan larvas que difieren de los adultos en hábitos, morfología y estructura; que mediante metamorfosis adquieren la forma adulta, y se desplazan hacia el medio terrestre (39, 46).

Origen y Evolución de los Anfibios

Desde el punto de vista evolutivo, los anfibios fueron los primeros vertebrados que prosperaron con éxito en el medio terrestre, además de ser los primeros tetrápodos conocidos (182). Como se ilustra en la Fig. 1 los anfibios se originaron a partir de un grupo de peces crossopterigios. Los primeros anfibios surgen hace aproximadamente 350 millones de años, en la era Paleozoica, en los periodos Devónico superior y Carbonífero inferior. Después de varios intentos de radiación evolutiva, con formas que no llegaron a sobrepasar el Triásico, una de ellas se estabilizó y originó a los grupos de anfibios actuales. Las especies de anfibios actuales pertenecen a alguno de los tres siguientes ordenes: Anura (sapos y ranas), Urodela (salamandras y especies afines) y Apoda (cecilias) (17, 182).

La evolución de los vertebrados mediante la transición de la vida acuática, con respiración branquial y cutánea, hacia el medio terrestre con respiración aérea, impuso nuevas y diversas exigencias. Se requirieron nuevos órganos locomotores, con integración nerviosa para coordinar la función de las distintas estructuras en la locomoción cuadrúpeda. La mayor concentración de oxígeno disponible en la atmósfera pudo ser ventajosa únicamente para los organismos que fueran capaces de resistir la desecación y servirse de sus órganos sensoriales en el nuevo ambiente. Se calcula que se requirió un periodo de 30 millones de años para desarrollar el más primitivo de los anfibios a partir de sus antecesores los peces, y otros 100 millones de años (m.a) para estabilizar las formas actuales.

Las pruebas geológicas revelan que los periodos Silúrico (hace 440-400 m. a.) y Devónico (hace 400-350 m. a.) fueron tiempos de sequías generalizadas con ríos y lagunas reducidos. Durante el final del Devónico es probable que algunos peces dipnóicos aprendieran a reptar por aguas poco profundas. Toda alteración que significara desarrollo muscular, sostén esquelético y regulación nerviosa de extremidades, representó gran ventaja selectiva. Otras ventajas accesorias

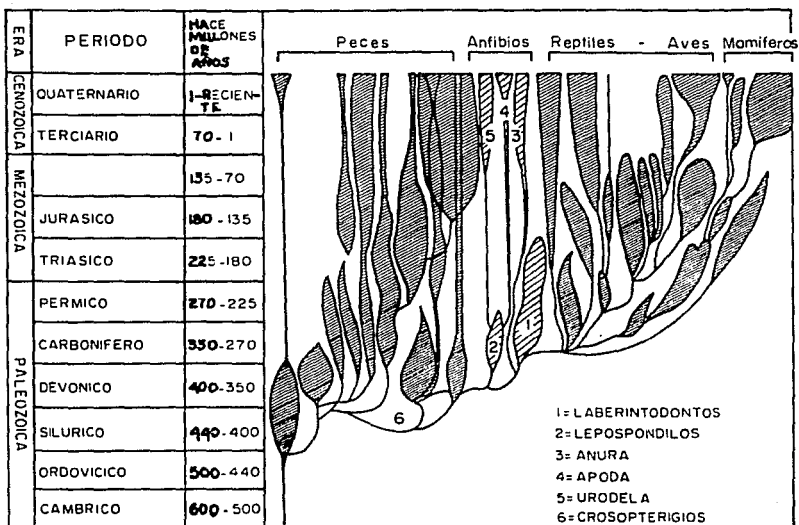


FIGURA 1. Clasificación de los vertebrados en relación a su origen filético y a la escala de tiempo geológico (16). Se señala la ubicación de los anfibios.

fueron los cambios adaptativos de la piel, de los órganos de los sentidos y del aparato respiratorio. Durante el periodo Carbonífero (hace 359-270 m.a.) los anfibios se dividieron en dos grandes grupos: los que prosperaron en la Tierra y los que sin lograrlo por completo, regresaron a su medio líquido original. Los anfibios primitivos fueron eliminados por sus descendientes, los reptiles, tanto en tierra como en el agua, de manera que sólo unos pocos sobrevivieron, y de ellos descienden las especies actuales. Los anuros probablemente derivaron del tronco de los peces laberintodontos, en tanto que los anfibios urodelos y apodos se derivaron de los peces lepospondilos y regresaron al habitat acuático tempranamente en la historia evolutiva de esta clase de vertebrados (17, 39).

El Ciclo de Vida de los Anfibios

Se considera que los anfibios son una evidencia viviente del proceso evolutivo respecto a la ocupación del medio terrestre. En la mayoría, durante su ciclo de vida se observan características de individuos adaptados a uno y otro medio ambiente. Un renacuajo se caracteriza por tener cola en forma de aleta caudal; por un sistema de línea lateral, por tres pares de branquias y tres pares aórticos pero sin pulmones en las fases iniciales de su desarrollo; por un corazón de dos cavidades, por un hueso hiomandibular que no llega a ser un hueso del oído medio y la ausencia de extremidades. El desarrollo posterior que lo convierte en un individuo adulto está dado por todas las adaptaciones a la vida terrestre que se adquieren de nuevo en cada ciclo biológico individual (182).

Especificaciones sobre sus Características

Sistema Locomotor. A partir de un antecesor de aletas lobuladas, los anfibios descendientes, han adquirido la capacidad de caminar en cuatro patas (182). Al igual que los anfibios primitivos, los urodelos vivientes conservan una forma semejante a la de los peces. En un pez, la columna vertebral tiene que resistir compresiones laterales sin perder flexibilidad. En los animales terrestres, la flexibilidad es menos necesaria, pero la resistencia debe aumentar, por lo que es imprescindible la conexión de la columna vertebral con las extremidades, de modo que esta característica se fijó desde los primeros tetrápodos. Sin embargo, los urodelos desarrollaron en menor grado que los anuros tales modificaciones estructurales, los primeros conservan su medio acuático de manera más estricta (39).

Piel. La piel lisa y sin escamas es otra adaptación importante en los anfibios actuales. La piel glandular y secretora de mucus protege ante la desecación (180, 182). La dermis de los anfibios presenta diferentes tipos de cromatóforos: melanóforos (tono claro u oscuro general), guanóforos (color verde azulado), lipóforos (diferentes matices a los azules y acentúa la coloración verde del anfibio), que responden a estímulos internos y externos tales como sensaciones

táctiles y viscerales. Además la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) regula la dispersión relativa de los pigmentos en los melanóforos (39, 46).

Sistema Respiratorio. El pulmón de los anfibios es esencialmente un saco formado por una capa celular por cuyas paredes ocurre el intercambio de gases. En los anfibios que han perfeccionado su sistema de respiración comienza el plegado pulmonar, con lo que se consiguen superficies mayores de intercambio gaseoso. En las especies acuáticas, los pulmones están menos plegados (algunas veces sólo sirven como órganos hidrostáticos, como la vejiga natatoria de los peces), con aumento proporcional de la vascularización de las paredes cutáneas, ya que el intercambio gaseoso en anfibios, ocurre principalmente a través de la piel que se auxilia de las branquias, los pulmones y la cavidad bucal (39, 182).

Las larvas de los anuros frecuentemente presentan branquias internas y externas por las cuales mantienen circulación de agua, mediante los músculos que en la vida adulta le servirán para la respiración pulmonar. Las larvas de los urodelos toman el oxígeno por las branquias internas que comunican con el exterior mediante ventanas branquiales. En los casos donde las formas larvarias alcanzan madurez sexual, de modo que no ocurre metamorfosis y el adulto aparece con aspecto larvario (neotenia) las branquias externas son permanentes (39).

Sistema Excretor. Todos los animales de agua dulce excretan amoníaco, producto terminal del metabolismo nitrogenado en el hígado. El amoníaco se diluye en el agua. Las larvas de anfibios excretan amoníaco, mientras que las formas adultas terrestres excretan urea. La obligada excreción de nitrógeno en los seres vivos depende del grado evolutivo y del hábitat. Por ejemplo, los peces de agua dulce excretan amoníaco, es decir son amoniotélicos; mientras que los peces de agua salada y las aves excretan urea, es decir son ureotélicos. Durante el ciclo de vida de los anfibios se pueden observar las dos modalidades (46, 72, 89). El sistema excretor en los anfibios es de tipo mesonefros adaptado particularmente a la eliminación de agua, pero no de sales (182).

Sistema Circulatorio. En el estado larvario presentan un corazón de dos cavidades. Un corazón con tres cámaras es una adaptación a la respiración aérea, capaz de impedir hasta cierto punto la mezcla de sangre oxigenada que retorna de los pulmones con la sangre venosa (182).

Oído. En los anfibios la mandíbula superior está fusionada con el cráneo; el hiomandibular queda libre y se convierte en la columela, un hueso del oído medio. Uno de los extremos de la columela está unido al tímpano externo, situado al ras del cuerpo y el otro extremo al oído interno. Dicho hueso transmite las vibraciones sonoras al oído interno (180, 182).

Línea Lateral. Las larvas de los anfibios están provistas de órganos de la línea lateral, que se conservan en los adultos, si la especie se mantiene en el medio acuático. La piel en los anfibios posee terminaciones nerviosas libres, sensibles al contacto, agentes químicos, temperatura y

traumatismos. Sin embargo, esas terminaciones no están conectadas a formaciones accesorias como en los tetrápodos más complejos (39, 126).

Gusto, Olfato y Visión. La boca está provista de papilas gustativas que son sensibles a los estímulos salados y ácidos. El olfato en anfibios es muy eficaz y se regula a nivel del órgano vomeronasal (51). El globo ocular es casi esférico, por lo que la visión al parecer es mejor bajo el agua que en el aire. El cristalino es más plano en los anuros que en los urodelos. El iris, reacciona a los cambios de intensidad de luz directamente y por mecanismos reflejos. La retina contiene conos y bastones, con una mácula central donde predominan los primeros (182).

Sistema Nervioso. En el sistema nervioso (SN) de anfibios se observan dos meninges: una pia madre vascularizada unida al encéfalo y a la espina dorsal, y una dura madre, adyacente a los huesos. Los patrones de distribución celular, con los cuerpos neuronales en torno a los ventrículos cerebrales, reflejan un patrón primitivo de organización (46). Sin embargo, el SN de los anfibios se encuentra en un punto intermedio entre los vertebrados. Conserva las características de los peces y presenta algunas modificaciones que son la base para su evolución posterior, hasta alcanzar un grado de complejidad tal como lo observamos en los mamíferos (71, 180).

En el encéfalo de los anfibios es posible distinguir las tres regiones principales del cerebro de los vertebrados "superiores": a) el procencéfalo o cerebro anterior; b) el cerebro medio o mesencéfalo y c) el cerebro posterior o rombencéfalo (cerebelo y médula oblongada), no obstante que el grado de organización es menos complejo (46, 71, 180).

a) **Cerebro Anterior** El cerebro anterior se divide en telencéfalo y diencéfalo. El telencéfalo se compone de un par de bulbos olfatorios y hemisferios cerebrales que son cortos y más invaginados en anuros. Cada hemisferio cerebral se divide en un palio dorsal y un subpalio ventral; se distingue por un surco sobre la superficie interior de los ventrículos y en anuros por una ranura sobre la superficie exterior. En el subpalio, se distingue un septum medial del ganglio basal lateral. También el palio se diferencia en un hipocampo interno y un primordio piriforme externo (46).

El telencéfalo es el receptor de impulsos sensoriales derivados del epitelio olfatorio de los sacos nasales. Todas las partes de los hemisferios cerebrales reciben impulsos de las fibras olfatorias (46, 180). En los peces y anfibios es algo más que un centro olfativo que recibe aferencias de los bulbos olfatorios y los envía a los hemisferios cerebrales. La base del telencéfalo (estriado) está involucrada en la integración de respuestas sensoriales y motrices (coordinación de respuestas condicionadas y comportamiento instintivo simple) (39). El septum y el estriado son estaciones sinápticas donde las fibras olfatorias se unen con las fibras del talamo y el cerebro medio (46).

La zona no pareada del cerebro anterior, el diencéfalo consiste de tres partes principales: el epitalamo (parte

dorsal), el tálamo (paredes lateral y ventral; zona engrosada) y el hipotálamo (zona posteroventral). El epitálamo se compone del ganglio abelular, un plexo coroideo (una invaginación vascularizada en el tercer ventrículo) que son anteriores, y el órgano pineal que es posterior. En ciclóstomos, en muchos peces y reptiles se observan estas estructuras; mientras que en anfibios están fusionadas (180).

El tálamo en peces y anfibios conecta la entrada olfatoria al cerebro medio. Contiene una rama de fibras que se conectan con todas las partes contiguas del cerebro, lo cual hace del tálamo un importante centro para la correlación sensorial. Se trata de una zona poco diferenciada en los vertebrados y es una de las áreas primitivas de integración más altamente desarrolladas que controla muchas formas de comportamiento instintivo complejo (39).

El hipotálamo se divide en las regiones preótica y tuberoinfundibular. En adición a numerosas fibras que se conectan con el tálamo ventral, el núcleo preóptico magnocelular se conecta al lóbulo ventral de la hipófisis y distintas áreas del núcleo parvocelular conectadas con los vasos portales hipofisarios. El hipotálamo contiene centros nerviosos que integran las funciones del sistema nervioso autónomo periférico con los otros tejidos nerviosos. Controla la regulación de la temperatura, funciones reproductivas, metabolismo del agua, grasas y carbohidratos. Contiene células neurosecretoras que producen las hormonas hipotalámicas liberadoras e inhibitoras que regulan la secreción de las hormonas de la adenohipófisis. Esta comunicación es de suma importancia y conforma el eje central del sistema neuroendocrino (39, 46, 180).

b) CEREBRO MEDIO El cerebro medio o mesencéfalo es principalmente un centro de asociación. Está formado por los lóbulos ópticos (tectum dorsal) y la porción peduncular. Los lóbulos ópticos y el tejido que compone al tectum están más desarrollados en los anuros (46).

El mesencéfalo de los vertebrados "inferiores" presenta dos cuerpos bigeniculados, que se observan como un ensanchamiento dorsal y actúan como centros del sentido de la vista (143, 180). El tectum también recibe proyecciones desde los núcleos sensoriales del rombencéfalo y de la médula espinal (39). La función del tectum óptico es el control visual sobre los movimientos del cuerpo como un todo, y particularmente la orientación del cuerpo y los movimientos conjugados de los globos oculares con referencia a los objetos en el campo visual. La región peduncular recibe fibras de prácticamente todo el cerebro anterior hacia la médula; su función principal es el control de movimientos en masa del cuerpo y las extremidades. También este es el punto de origen de los músculos ópticos (46).

La iniciación y coordinación de la actividad motora se localiza en el techo del mesencéfalo (143, 180). En algunos anfibios se ha descrito que el tectum; en adición a las proyecciones de los estímulos visuales también contiene proyecciones aferentes con información somatosensorial (68);

incluso se ha encontrado que algunos impulsos somatosensoriales hacia el tectum son de origen espinal y serotoninérgicos; con proyecciones serotoninérgicas espinotectales bilaterales (67).

c) CEREBRO POSTERIOR. El rombencéfalo (cerebelo y médula oblongada) constituye la región posterior del cerebro y es continuo con la médula espinal. El cerebelo de los anfibios consiste de las protuberancias paramedias dorsales y un par de lóbulos auriculares más laterales, que son una continuación del sistema acusticolateral de la médula. En comparación con otros vertebrados el cerebelo es pequeño, especialmente en anfibios adultos terrestres. El cerebelo de anuros tiene una verdadera laminación de células y fibras, y las células de Purkinje (células interlaminares con forma de matriz) tienen una estructura más definida que en otros anfibios. El cerebelo es el centro de la coordinación motora, y el pequeño tamaño presumiblemente se correlaciona con las actividades locomotoras comparativamente sencillas de los anfibios. El grado de desarrollo de los lóbulos auriculares se asocia con la presencia del sistema de línea lateral. Las larvas y los urodelos neoténicos tienen lóbulos auriculares más grandes. Fibras provenientes de prácticamente todas las partes del cerebro terminan en el istmo. El istmo está situado entre el cerebelo y la médula (46).

En el rombencéfalo se encuentran los centros de asociación con los nervios que llegan a la línea lateral y el oído interno. En esta región se encuentran los cuerpos celulares de las células de Mauthner, cuyas prolongaciones recorren la médula espinal y controlan los movimientos coordinados del tronco y la cola. Este par de células se observa en los anfibios durante los estados larvarios y en adultos acuáticos (neoténicos), (143, 180). Cuando se presenta la metamorfosis completa, las células de Mauthner desaparecen (113). Todos los nervios sensoriales, excepto los de la visión y el olfato, así como las fibras que controlan casi todas las motoneuronas pasan a través del rombencéfalo. Muchos nervios sensoriales establecen sinapsis en el rombencéfalo y proporcionan información necesaria para el control propioceptivo del equilibrio, los movimientos y reflejos auditivos simples. Para estas funciones son importantes las aferencias procedentes de los nervios vestibular y coclear (39).

Glándula Hipófisis. La hipófisis es muy semejante en todos los tetrápodos en su morfología y función. Se localiza en la base del cerebro, en la región del diencefalo y se conecta con éste por medio del tallo hipofisiario. Consta de tres porciones o lóbulos principales: anterior (pars distalis), intermedio (pars intermedia) y posterior (pars nerviosa). Existe un cuarto componente, conocido como pars tuberalis, que en realidad se trata de una porción modificada del lóbulo anterior. Los lóbulos anterior e intermedio forman la adenohipófisis o bolsa de Rathke. La pars tuberalis se constituye por dos placas epiteliales unidas a ambos lados del tallo hipofisiario, anterior a la eminencia

media. En anuros, la adenohipófisis es ventral y posterior al lóbulo neural. La pars distalis es más amplia que larga, dorsalmente se continúa con la pars intermedia y anteriormente se conecta con la eminencia media por una cadena de tejido conectivo a través del cual pasan los vasos portales (17). En urodelos la pars distalis ocupa la misma posición pero es más alargada (Fig. 2). La neurohipófisis se origina a partir del infundíbulo, una evaginación ventral del diencéfalo embrionario. Esta región incluye en realidad a la eminencia media del tuber cinereum del hipotálamo, al pedúnculo infundibular que contiene axones de las células nerviosas de núcleos hipotalámicos y al lóbulo neural en sí (180). El lóbulo neural es generalmente más grande en los anfibios terrestres (17, 44)

La capacidad funcional de la hipófisis completa depende de su comunicación nerviosa y vascular con el hipotálamo. Esta conexión es indispensable para el control de las secreciones hipofisarias en respuesta a estímulos endógenos o externos integrados por el cerebro. La función de la adenohipófisis está sujeta a la regulación neurosecretora del hipotálamo, a través de las fibras del tracto hipotálamo-hipofisario y por medio de los vasos portales hipofisarios (17, 44, 46).

La adenohipófisis produce diferentes hormonas: hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), PRL, TSH, la hormona del crecimiento (GH) y hormona adreno-corticotrópica (ACTH). La función de este grupo de hormonas es básicamente la misma que en los otros vertebrados. La PRL en anfibios interviene en la producción de la gelatina en los oviductos, produce cambios glandulares y estimula la proliferación de melanomas en el integumento, estimula el crecimiento de tejidos caudales y branquiales y se ha postulado que es un antagonista de las hormonas tiroideas en la metamorfosis. La TSH estimula la secreción de hormonas tiroideas en la glándula tiroides, mismas que estimulan la metamorfosis. La pars intermedia secreta: MSH, que regula los cromatóforos integumentarios; causa la dispersión de los melanomas en los melanóforos. La neurohipófisis secreta la hormona antidiurética (ADH), la arginina vasotocina (AVT) y la oxitocina (OXT). La ADH causa un incremento en la tasa de reabsorción en los tubulos del riñón, secundariamente causa un decremento en la tasa de filtración glomerular. La AVT y la OXT incrementan la permeabilidad del agua y sales en piel, riñones y vejiga urinaria (46).

Casos Especiales

Los anfibios se han adaptado a la vida terrestre en muchos aspectos, sin embargo, en algunas especies, las modificaciones adaptativas se salen del patrón general. Se conocen especies, como el anuro Previceps, que presenta una capacidad notable para labrar galerías, gracias a un hocico prolongado como el de los vertebrados hormigueros. Entre los anuros son comunes las especies arbóreas, principalmente en climas tropicales y se conocen anuros estrictamente acuáticos como Ascaphus. Entre los urodelos se conocen varias modificaciones especiales. Por ejemplo Salamandra maculosa y Ambystoma, de

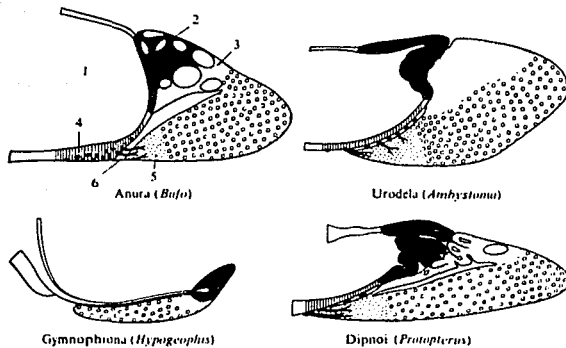


FIGURA 2. Estructura de la glándula hipófisis correspondiente a los 3 principales grupos de anfibios en comparación con los peces pulmonados. 1= saco infundibular, 2= lóbulo neural, 3=pars intermedia, 4= eminencia media, 5= "zona tuberalis", 6= vasos sanguíneos portales (16).

América del Norte, son básicamente terrestres, al contrario de la mayoría de las especies de este orden, cuyo medio es acuático. La salamandra gigante de China y Japón, Megalobatrachus, llega a medir hasta dos metros de longitud, carece de parpados y pierde sus branquias al ser un animal adulto. Ambystoma mexicanum no alcanza la metamorfosis, de modo que se reproduce conservando sus características de morfología y hábitos larvarios (39).

Biología del axolotl Ambystoma mexicanum

Taxonomía: El término axolotl o ajolote, que en nahuatl significa moustro, sirviente o duende del agua (157); se ha utilizado para referirse a una gama amplia de especies del género Ambystoma, donde las formas adultas presentan branquias largas. Sin embargo, el nombre axolotl se asocia principalmente con la especie que se distribuyó en el Valle de México y actualmente sólo se localiza en algunos puntos de los canales de Xochimilco. El consenso reciente entre los zoólogos es que al hablar de axolotl, es sólo en relación a la especie Ambystoma mexicanum (20).

A. tigrinum y A. lermaensis son dos especies que comúnmente se confunden con A. mexicanum. Sin embargo, el grado de neotenia en tales especies es distinto (ver sección; Neotenia, pags. 22-23).

A. tigrinum es una especie neoténica facultativa que se distribuye a lo largo del eje neovolcánico y en algunas poblaciones existen organismos tanto neoténicos como metamorfoseados, principalmente en las regiones de Puebla y Tlaxcala (20, 157).

De la especie A. lermaensis también pueden encontrarse organismos neoténicos, que por su coloración oscura, pueden confundirse con A. mexicanum. El acuerdo tomado por la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica en 1963 y 1974 fue que el nombre científico Ambystoma mexicanum es para referirse a la especie neoténica de los canales de Xochimilco y se descartó la posibilidad de coespecificidad con A. tigrinum (157). La clasificación de la especie que nos ocupa es la siguiente (157, 180).

Reino:	Animal
Phylum:	Chordata
Subphylum:	Vertebrata
Superclase:	Tetrápoda
Clase:	Anfibia
Orden:	Urodela
Género:	<u>Ambystoma</u>
Especie:	<u>mexicanum</u>
Nombre Científico:	<u>Ambystoma mexicanum</u>

Ciclo de Vida y Reproducción: A. mexicanum en su medio natural se encuentra como una forma neoténica, que no presenta evidencias externas de metamorfosis, que es madura sexualmente y se reproduce conservando su morfología y hábitos larvarios (20, 46, 88). Se considera que la neotenia en

A. mexicanum surgió inicialmente como una forma de sobrevivencia que dio lugar a un mecanismo adaptativo ante las condiciones ambientales y que se relaciona con las aguas frías de los lagos en zonas montañosas del Valle de México y la escasez relativa de iodo disponible en el agua (57, 182).

Desde el siglo VII A. mexicanum ha llamado la atención de muchos investigadores en diversos países, principalmente por su característica neoténica (46, 88). La relativa sencillez de mantenimiento así como las posibilidades de manipular experimentalmente su ciclo reproductivo, ha permitido la formación de varias colonias de la especie en los Estados Unidos de Norte América, Canadá y varios países de Europa, con el objeto de utilizarlo como animal de experimentación, principalmente en estudios de genética y diferenciación (8, 20, 154).

La formación de la colonia de A. mexicanum como parte del trabajo de la presente tesis considera estos aspectos y aborda a la especie no únicamente como animal de experimentación sino también como objetivo de estudio.

Se conoce muy poco respecto a su ciclo de vida en la naturaleza. Brandon (21) menciona que una especie cercana (A. dumerilii) se reproduce durante la primavera. Y Smith (157) plantea que por ser especies cercanas a A. mexicanum el proceso reproductivo podría presentarse en la misma estación.

Por otro lado, los datos de las diferentes colonias respecto al momento de la reproducción son variables; aunque se observa que aún en cautiverio, A. mexicanum conserva cierta estacionalidad al respecto. Algunas colonias reportan eventos reproductivos durante todo el año, con una frecuencia mayor durante el invierno y/o la primavera (9, 10, 112). Los datos son concordantes respecto a que de manera natural A. mexicanum presenta un ciclo reproductivo anual, mismo que puede modificarse durante todo el año por manipulación experimental, mediante la administración de hormonas gonadotrópicas (9, 10). Nuestros resultados, tanto de los registros de campo para la formación de la colonia así como con respecto a los desoves en el laboratorio, concuerdan con los planteamientos anteriores. Nosotros hemos registrado desoves tanto en el campo como en el laboratorio en las estaciones de invierno y primavera principalmente (31).

Los datos de laboratorio indican que la reproducción de A. mexicanum, como en otros anfibios urodelos, incluye los siguientes eventos: maduración de gametos, comportamiento de cortejo macho-macho, depositación del espermatóforo, interacciones macho-hembra, captura del espermatóforo por parte de la hembra a través de la cloaca, fecundación interna y ovoposición de los óvulos fecundados (10, 46, 112). La hembra deposita los huevecillos en algún sustrato; plantas, piedras o manguera de suministro de aire en forma de espiral. El desarrollo embrionario dura entre 15 a 20 días e incluye el pleno desarrollo de las branquias así como de las extremidades anteriores, momento en que las larvas eclosionan y desarrollan las extremidades posteriores. A partir de este momento no se observan modificaciones morfológicas externas marcadas. Se presenta el crecimiento y maduración sexual que culmina en los

organismos adultos, mismos que se reproducirán en el medio acuático (31).

La posible extinción de la especie. Otro aspecto de suma importancia desde el punto de vista biológico es que A. mexicanum es una especie endémica del Valle de México, es decir que en habitats naturales únicamente se ha desarrollado en esta región (20). La eliminación paulatina de los cuerpos de agua del Valle de México han restringido y casi eliminado el habitat de esta especie. En la época de la conquista se distribuía a lo largo del Gran Lago (Zumpango, Xaltocan, San Cristobal, Texcoco; Chalco y Xochimilco) (20, 157). Hacia 1948, la especie se localizaba aún en el Lago de Xochimilco y Chalco (158) y para 1950, su localización se restringe a Xochimilco (159). En la última década, A. mexicanum se ha localizado solo en algunos puntos de lo que queda del Lago de Xochimilco. Los altos índices de contaminación y la modificación constante de la zona son factores que contribuyen a la extinción de la especie (20, 62). El lograr su reproducción en cautiverio podría contribuir de alguna forma a su preservación en estudios futuros donde se plantea su reproducción en semicautiverio.

2.2 Metamorfosis

En la mayoría de los casos, el ciclo biológico de los anfibios comprende dos fases con características morfológicas y fisiológicas específicas. En la primera, como organismos larvarios acuáticos, y en la segunda, como adultos terrestres (12, 39, 46, 182). El cambio entre las dos principales etapas se conoce con el nombre de metamorfosis. Se considera que la metamorfosis es un mecanismo morfo-fisiológico que prepara a los organismos para adaptarse a un nuevo habitat (17, 57).

Cambios Morfo-Fisiológicos

Los cambios morfo-fisiológicos y de organización estructural del animal durante la metamorfosis son en parte progresivos y en parte regresivos, y pueden agruparse en tres categorías (12, 46, 72):

A. Reducción o eliminación total de estructuras y funciones que son necesarias durante la vida acuática y que no son útiles en el medio terrestre (aletas, branquias, células de Mauthner y la cola en los anuros).

B. Reorganización estructural: Desarrollo de algunos órganos que sólo son funcionales durante la metamorfosis y/o después de esta (engrosamiento de piel, se vuelve más resistente a la desecación, desarrollo de parpados, modificación del aparato branquial y en anuros, acortamiento del intestino).

C. Organos que adquieren su función plena: estructuras que aunque existen antes y después de la metamorfosis, cambian para servir a los requerimientos de la vida terrestre (pulmones, extremidades, ojos, oído, etc.). Los pulmones no

experimentan cambios drásticos durante la metamorfosis. Se desarrollan gradualmente y en potencia son funcionales en la fase larvaria. Mucho antes de la metamorfosis las formas larvarias, tanto de anuros como de urodelos, empiezan a subir a la superficie para engullir aire en sus pulmones y así suplementar su respiración acuática.

La descripción anterior corresponde al patrón general de los anfibios anuros. En ellos las diferencias entre la forma acuática y la terrestre son mucho más pronunciadas, por lo que los cambios durante la metamorfosis son mayores que en los urodelos. En estos últimos la metamorfosis es más gradual y dura varias semanas (12, 46). Se considera que el desarrollo en los urodelos es menos especializado; ya que la morfología larvaria no pasa del animal con branquias externas, y no existen los estadios de larva con branquias internas y de la premetamorfosis. En el curso del desarrollo primero se observa la formación de extremidades anteriores y luego de las posteriores (72), al contrario que en anuros. Los urodelos se distinguen de los otros dos ordenes de anfibios por la forma del cuerpo (180). En los urodelos puede distinguirse bien la cabeza, el tronco y la cola permanente. Las larvas son estructuralmente muy parecidas a las formas adultas, en ambos estadios, los dos pares de extremidades son débiles. A continuación se anotan los principales cambios morfológicos que ocurren durante su metamorfosis (12):

- A. Reabsorción de los pliegues dérmicos (aleta dorsal y caudo-dorsal) y conservación de la cola.
- B. Las branquias externas se reabsorben y las hendiduras branquiales se cierran.
- C. Reducción notable del esqueleto visceral.
- D. La cabeza adquiere un aspecto más ovalado.
- E. Los ojos sobresalen más a la superficie dorsal de la cabeza y se forman párpados.
- F. La piel se cornifica y se diferencian glándulas cutáneas pluricelulares. También la pigmentación tiende a cambiar.
- G. Las extremidades experimentan cambios mínimos, hay reabsorción de las membranas interdigitales.

Una característica notable que se desarrolla al inicio de la metamorfosis de los urodelos es la presencia de mudas de piel, característica que perdura en las formas metamorfoseadas (72).

Cambios Bioquímico-Fisiológicos

Durante este periodo se inicia la función endocrina del páncreas que se asocia a la mayor participación del hígado en el metabolismo de los carbohidratos (glucógeno) (72). En el hígado durante la metamorfosis se observa un incremento en la síntesis de ADN, síntesis y acumulación de una cantidad estable de ARN transcripcional, con elaboración de retículo endoplásmico rugoso y un incremento en el número de mitocondrias (168). Las proteínas recién sintetizadas incluyen a las enzimas del ciclo ornitina-urea, que se desarrolla en asociación con la transición del amonitelismo al ureotelismo (89). El hígado empieza a producir las enzimas necesarias para la síntesis de urea. Durante la vida larvaria en los anfibios, el producto final del metabolismo nitrogenado es el amoniaco, que se elimina fácilmente por difusión en el agua. En los animales terrestres el amoniaco resulta tóxico, por lo que la mayor parte de los productos de excreción de compuestos nitrogenados es en forma de urea y pequeñas cantidades de amoniaco. Este cambio metabólico ocurre durante las últimas fases de la metamorfosis (39, 117).

La reducción de las branquias, las aletas y la cola durante la metamorfosis implica la apoptosis o muerte programada de las células que forman tales órganos (169). Este efecto depende de la presencia de hormonas tiroideas y está mediado por un aumento en la actividad de enzimas proteolíticas. Las células caudales están provistas de lisosomas con enzimas hidrolíticas (catepsina, fosfatasa ácida, ribonucleasa, colagenasa y desoxiribonucleasa), cuya actividad aumenta durante la metamorfosis (72). De hecho la colagenasa fue descrita por vez primera en la aleta caudal de renacuajos durante la metamorfosis. Al cultivar pequeñas porciones de aleta caudal sobre una capa de colagena fibrosa fue posible determinar la actividad colagenolítica. La colagenasa se localiza principalmente en tejidos de anfibios y mamíferos durante procesos de crecimiento o reorganización (65).

La composición de las proteínas del plasma también cambia. Se producen albúminas en mayor cantidad durante la metamorfosis. En la sangre del organismo larvario no existe la seroalbúmina, que sí está presente en el adulto (46).

Durante el periodo larvario la sangre tiene mayor capacidad de fijar oxígeno, mientras que después de la metamorfosis hay mayor capacidad de liberación del mismo. Con la metamorfosis se presenta una transición notable en la hemoglobina y el significado adaptativo del cambio se asocia con el hecho de que la hemoglobina de renacuajos tiene mayor afinidad por el oxígeno; los organismos se encuentran en un medio acuático donde la tensión de oxígeno es baja. La hemoglobina adulta tiene menor afinidad por el oxígeno que la hemoglobina larvaria, pero en adultos libera una proporción de oxígeno considerablemente mayor a la tensión de oxígeno que prevalece en los tejidos de adultos terrestres (56).

En *Rana catesbeiana* se han identificado cuatro moléculas de hemoglobina que son distintas en larvas (I-IV) a las cuatro principales hemoglobinas (A-D) en adultos. Los

cambios entre uno y otro tipo ocurren durante la vida larvaria. En la premetamorfosis temprana, alrededor del 90% de la hemoglobina total corresponde a los componentes I y II; mientras que en la premetamorfosis tardía, cerca de dos terceras partes de la hemoglobina la constituyen los componentes III y IV (25). De las cuatro hemoglobinas adultas, la A y la D están en una proporción relativamente menor, y el componente C tiene mayor afinidad por el oxígeno que el B. El componente C es el primero en aparecer con la metamorfosis (46).

En urodelos se han identificado tres tipos principales de hemoglobina en larvas y tres distintas en adultos (185). Los cambios ontogenéticos en la hemoglobina son similares a los que se observan en anuros con respecto a la afinidad por el oxígeno. La transición de las hemoglobinas larvales hacia adultas ocurre en el momento de la metamorfosis morfológica en A. tigrinum; una transición similar ocurre alrededor del mismo grado de desarrollo (100-150 días) en A. mexicanum, pero en este caso la transición no se acompaña de la metamorfosis morfológica (45, 46, 172).

La masa corporal, al final de la metamorfosis es menor que en los organismos sin metamorfosis, debido tanto al proceso destructivo y reductivo de algunas estructuras como al hecho de que la ingesta de alimento puede interrumpirse durante el periodo crítico de la transformación (12).

Cambios Conductuales y de Hábitos Alimenticios

Los cambios conductuales tienen que ver principalmente con la adquisición de alimento, la reproducción, la protección ante sus depredadores y la pérdida de humedad. Tales actividades las regula el sistema nervioso y los órganos de los sentidos (39, 104).

Los cambios en la dieta, no son substanciales en los urodelos, las larvas son tan carnívoras como los adultos, aunque se alimentan de animales menores, principalmente crustáceos y gusanos. En contraste, en los anuros, hay un cambio de hábitos principalmente herbívoros, hacia hábitos carnívoros, diferencia que se asocia con un intestino muy largo en las fase larvaria, como en la mayoría de los animales herbívoros, que se acorta notablemente con la metamorfosis (12).

Las posibilidades de pérdida de agua por evaporación, una vez que se presenta la metamorfosis son notables. En Rana catesbeiana se ha demostrado que la actividad secretora de las glándulas mucosas del integumento, cuyo producto es altamente acuoso, se encuentra bajo control nervioso y la intensidad de la secreción varía directamente con la temperatura corporal interna y con la del termostato hipotalámico (39, 104). El control de la temperatura que los anfibios realizan mediante el comportamiento es menos preciso que en los reptiles, aunque más impresionante ya que se trata de animales, hasta donde se sabe, exclusivamente ectotermos.

La reducida tasa metabólica de los anfibios les permite el ayuno por largos intervalos de tiempo y ser activos sólo durante los limitados periodos en los que las condiciones de

temperatura y disponibilidad del agua son las adecuadas. Entre las especies del genero Ambystoma se registran temperaturas corporales entre los 15 y 28°C, con un intervalo que puede disminuir hasta 9 grados (104).

En los ambystomoideos que son permanentemente acuáticos, sus temperaturas corporales están siempre en equilibrio térmico aproximado con el agua que los envuelve y por tanto su control de temperatura consiste principalmente en la elección del microhabitat. Generalmente, los adultos acuáticos evitan aguas con temperaturas superiores a 18 o 20°C, pero no se esfuerzan por evitar temperaturas cercanas a cero. Se considera que en los anfibios al igual que en el resto de los vertebrados, el hipotálamo actúa como un termostato que activa o incrementa el mecanismo que minimiza la pérdida de calor (39, 104).

Factores que Determinan la Metamorfosis en Anfibios

Se sabe que existe un componente genético que puede ser influenciado por factores medioambientales (temperatura, luz, alimentación, salinidad, acidez del agua, proximidad con sus depredadores y otros anfibios., etc). Se propone que la recepción e integración de los estímulos que inician la metamorfosis ocurre a nivel del sistema nervioso, específicamente, en diencéfalo, en la región correspondiente al hipotálamo, que a su vez controla la función hipofisiaria (17, 46). La metamorfosis en los anfibios se regula por hormonas e intervienen al menos tres órganos de secreción interna: el cerebro, la hipófisis y la tiroides. Por lo cual se asume que la mayoría de los cambios concurrentes con la metamorfosis los regula el sistema neuroendocrino (46, 52, 53, 88).

Interacciones Hipotálamo-Hipofisiarias

En el proceso de la metamorfosis, la interrelación funcional del sistema nervioso y la hipófisis es importante. En renacuajos a los cuales se les extirpa la hipófisis, o bien se les transplanta a un sitio alejado del hipotálamo; Vgr, la cola, no ocurre metamorfosis. Los renacuajos con hipófisis ectópica (transplantados) se hiperpigmentan y crecen significativamente, lo cual indica la liberación incontrolada de MSH y de PRL, hormonas hipofisiarias cuya secreción normalmente es inhibida de manera tónica por el hipotálamo (17, 44, 182).

La hipofisectomía y la ausencia de metamorfosis puede compensarse mediante la reimplantación de hipófisis de ranas adultas, siempre y cuando la glándula tiroides esté intacta. En ausencia de la tiroides, ningún tejido hipofisiario produce metamorfosis, lo cual indica que el efecto metamórfico de la hipófisis es secundario a su acción estimulante sobre la glándula tiroides (17, 123). Esta secreción hipofisiaria se halla a nivel del lóbulo anterior, ya que los injertos tanto de la glándula completa como del lóbulo anterior permiten la metamorfosis de larvas hipofisectomizadas (54).

La TSH es el agente responsable de la activación de la glándula tiroides (46, 72). La hipófisis de los renacuajos también produce otra hormona, que actúa como antagonista de la T4

durante la vida larvaria; su naturaleza química es muy similar o posiblemente idéntica a la de la PRL (18).

Se ha propuesto que la PRL estimula el crecimiento y retarda la metamorfosis. La inyección de la PRL en renacuajo antagoniza la reabsorción de la cola T4-inducida y detiene la metamorfosis (54, 88). Se piensa que la PRL antagoniza las acciones periféricas de las hormonas tiroideas y también ejerce un efecto inhibitorio sobre la glándula tiroides (efecto bociogénico) (46, 181). Se ha observado que la PRL determina el momento de la metamorfosis natural y bloquea la inducción precoz de metamorfosis inducida por hormonas tiroideas exógenas (120, 169).

En cultivos de órganos (cola y extremidad anterior) de renacuajo de Xenopus levis, la PRL inhibe la morfogénesis y la muerte celular programada, inducidas por hormonas tiroideas durante la metamorfosis (169). En un estudio más reciente se ha encontrado que en renacuajo de Xenopus, la PRL inhibe la autoinducción primaria del ARNm de los receptores alfa y beta para las hormonas tiroideas. Se sugiere que la inhibición de la autoinducción de los genes alfa y beta del receptor de las hormonas tiroideas, podría explicar la acción antimetamórfica de la PRL en anuros (16). Tales efectos parecen estar confinados a los anfibios ya que por el momento no se conocen en mamíferos.

Glándula Tiroides

La participación de la glándula tiroides durante la metamorfosis de anfibios fue demostrada hacia principios del siglo XX por dos experimentos clásicos. El primero realizado por Gudernatsch en 1912, consistió en alimentar larvas de rana con glándulas tiroides de cordero e inducir su metamorfosis precoz. El otro, consistió en tiroidectomizar embriones de rana en la fase de yema caudal, con lo cual inhibió la metamorfosis y los renacuajos alcanzaron tallas muy por encima de lo normal. Los renacuajos tiroidectomizados se metamorfoseaban si se mantenían en agua con extractos solubles de glándula tiroides (5). En estudios posteriores; Allen (4) concluyó que la metamorfosis dependía de las hormonas tiroideas más que de la integridad de la glándula misma (4). Estudios más recientes muestran que la metamorfosis en renacuajos se acompaña por un súbito incremento en la actividad de la glándula tiroides, como lo indican los cambios histológicos y el aumento en la captura de iodo radioactivo; así como en la concentración plasmática de las hormonas tiroideas: T3 y T4 (88, 90).

Durante la metamorfosis, el epitelio folicular de la glándula tiroides se hiperplasia y exhibe numerosas vacuolas fagolisosomales de reabsorción del coloide tiroideo. El coloide tiroideo se constituye principalmente por tiroglobulina (Tgb). Esta glicoproteína de aproximadamente 660 Kd es específica de la glándula tiroides de todos los vertebrados y su estructura esta altamente conservada. Contiene alrededor de 140 residuos de tirosina en los cuales, por acción de la peroxidasa tiroidea ocurre la organificación del iodo formándose los iodo aminoácidos, mono- o di-

iodotirosina. En la estructura primaria de la Tgb se reconocen cuatro dominios homogéneos que permiten la síntesis de T4 y T3 en proporción de 3:1 por cada molécula de Tgb. La peroxidasa también cataliza la reacción de acoplamiento que da lugar a la formación de las hormonas. La T4 se produce en mayor cantidad que la T3; si bien la T3 es la hormona activa en los tejidos periféricos (17, 46). De hecho, a la fecha se ha demostrado que la metamorfosis en anfibios se caracteriza por la dependencia obligada de las hormonas tiroideas tanto para su iniciación como para su finalización (59).

La influencia de la T4 en la metamorfosis de los anfibios se ejerce mediante una modificación en la actividad del genoma en los tejidos reaccionantes. Tata (168) demostró que la primera reacción ante la administración de T4 es un incremento del RNA nuclear en los tejidos de los renacuajos, alrededor de 50 horas después de su aplicación (168). Cohen (36) observa un aumento en el RNA citoplasmático 20-30 horas después de la administración de T4 (36). Del mismo modo, la acción antimetamórfica de la PRL en tejidos periféricos de Xenopus laevis, inhibe la activación de los genes que codifican la síntesis de los receptores de las hormonas tiroideas (16).

Integración Hormonal de la Metamorfosis en Anfibios Anuros (Modelo de Etkin)

Basado en el análisis cuidadoso y crítico de diferentes evidencias experimentales, Etkin, propuso un esquema que explica los mecanismos de regulación de la metamorfosis en los anfibios anuros (52, 53). El esquema (Fig. 3) describe la secuencia de cambios histológicos y los cambios en los niveles de diferentes mensajeros químicos en el sistema neuroendocrino. Sobre estas bases, divide a la metamorfosis en tres etapas principales:

1. Premetamorfosis: Ocorre un crecimiento rápido del organismo, coincidente con la hiposecreción de TSH y hormonas tiroideas e hipersecreción de PRL. Se propone que esta situación es consecuencia de inmadurez anatómica y funcional de la eminencia media, que en esta fase es indiferenciada, así el cerebro ejerce poco o ningún control sobre las funciones adenohipofisarias. La PRL puede promover el crecimiento larval sin la interferencia de las hormonas tiroideas. En esta fase las hormonas tiroideas ejercen un mecanismo de retroalimentación negativa sobre la secreción de la TSH.

2. Prometamorfosis. En esta etapa prácticamente no hay crecimiento, pero incrementa la diferenciación del organismo. Se plantea que la maduración progresiva del eje hipotálamo-hipofisario marca el inicio de esta etapa. La concentración de la T4 también incrementa progresivamente y el hipotálamo continúa su maduración bajo la influencia de esta hormona y se acompaña de un aumento gradual de la síntesis y secreción de la hormona hipotalámica liberadora de la tirotropina (TRH) y de la TSH. La concentración de la T4 también incrementa

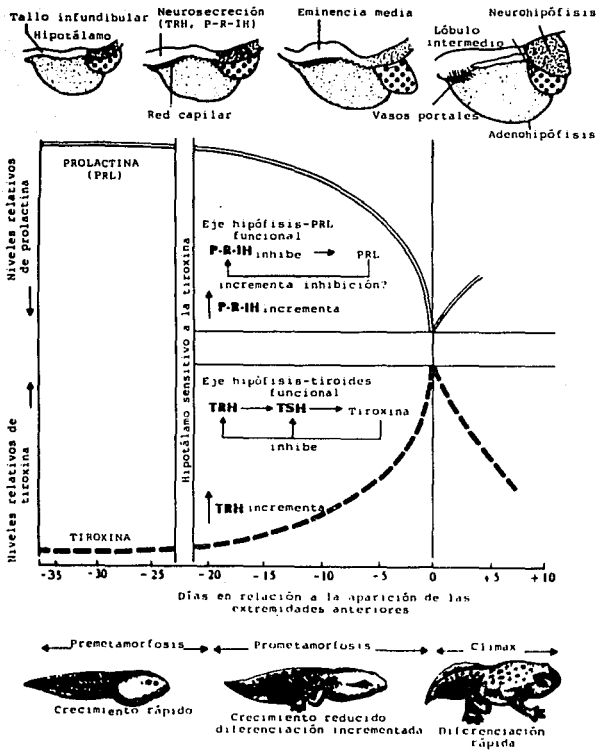


FIGURA 3. Esquema sobre la regulación hormonal de la metamorfosis de anfibios anuros, según el modelo propuesto por Etkin, (52, 53) En el extremo superior se señala el desarrollo de la hipófisis, respecto al establecimiento de sus conexiones con el hipotálamo. En el resto del esquema se presentan los cambios en la actividad y concentración hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Los principales eventos son: a) la adquisición de sensibilidad a la tiroxina por parte del hipotálamo, el cual acelera el desarrollo. b) el inicio del papel definitivo de la TRH, la hormona inhibidora de la liberación de la PRL (P-R-IH), c) así como de la TSH y el incremento en la secreción de la tiroxina; mientras la secreción de la PRL decrece.

progresivamente y el hipotálamo continúa su maduración bajo la influencia de esta hormona (retroalimentación positiva). Conforme se desarrolla el control hipotalámico sobre la hipófisis, la secreción de la PRL queda bajo un control inhibitorio, y los niveles circulantes de PRL decrecen progresivamente. El antagonismo de la PRL sobre la acción de las hormonas tiroideas en los tejidos periféricos se reduce. Durante la prometamorfosis, la eminencia media y sus conexiones vasculares con la hipófisis se han desarrollado substancialmente.

3. Climax Metamórfico. Esta etapa se caracteriza por la aparición de cambios explosivos: la cola se reabsorbe, emergen las extremidades anteriores y el renacuajo se convierte en una rana o sapo adaptada a una existencia terrestre. Cuando la maduración de la comunicación vascular en la unidad hipotálamo-hipófisis se ha completado y la sangre portal llega a la adenohipófisis ocurre la estimulación masiva de la tiroides, vía TRH y TSH, dando lugar al climax metamórfico. Después este último periodo, los niveles de T4 empiezan a declinar debido a un mecanismo de retroalimentación negativa.

Diversos estudios concuerdan con este esquema. Mientras que la captura tiroidea de iodo y los niveles de hormonas tiroideas en sangre son bajos en la premetamorfosis, incrementan progresivamente durante la pre y prometamorfosis, alcanzan sus valores máximos en el climax metamórfico y retornan a valores bajos en el periodo postclimax y postmetamórfico (42). Este modelo es aceptado de manera general, sin embargo hay algunas discrepancias, sobre todo con respecto a la participación de la PRL y la TRH (40, 88).

Metamorfosis en Anfibios Urodelos

Como ya se mencionó, los urodelos también presentan metamorfosis, aunque los cambios son menos dramáticos que en anuros. En ambos grupos, la metamorfosis esta bajo el control del sistema neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-tiroides. En este grupo también se propone la participación de la PRL como inhibidor de la metamorfosis (61); sin embargo, los resultados aún son contradictorios en el caso de urodelos neoténicos (40, 88).

Es claro que la metamorfosis en los anfibios se desencadena cuando entra en actividad la glándula tiroides, regulada por la hipófisis y el hipotálamo. En algunos urodelos el mecanismo tiroideo final no es funcional por lo que los animales conservan su morfología larvaria y permanecen en el medio acuático. Sin embargo, una característica adulta escapa a la inhibición del desarrollo; el sistema reproductor. En consecuencia los animales pueden reproducirse a pesar de sus características morfológicas de larva. La conservación de las características larvarias por parte de organismos sexualmente maduros recibe el nombre de neotenia. Entre los ejemplos más representativos de anfibios neoténicos encontramos a Necturus maculatus y Ambystoma mexicanum (88).

Metamorfosis en *Ambystoma mexicanum*

Independientemente de los cambios somáticos durante el desarrollo de *A. mexicanum*, ocurren algunos cambios normalmente asociados con la metamorfosis de anfibios durante su desarrollo; Vgr., el cambio de los tipos de hemoglobina y el inicio del ureotelismo (46, 88, 89, 172)

A pesar de que *A. mexicanum* no se metamorfosea en su habitat, la administración de T3, T4 o TSH provoca metamorfosis (88, 136). Su hipófisis presenta células productoras de TSH. Los extractos hipofisiarios de *A. mexicanum* tienen actividad tirotrópica (150). En base a tales evidencias se plantea que la ausencia de metamorfosis en *A. mexicanum* no puede atribuirse a la carencia de hormonas tiroideas en la glándula tiroidea, ni de TSH en la hipófisis. Parece deberse a la inhabilidad de la hipófisis para liberar la TSH que contiene, por la falta del estímulo adecuado. Se proponen dos posibles causas: 1) Que la hipófisis sea insensible a la TRH, hormona presente en el hipotálamo de *A. mexicanum*, pero que no parece participar en la metamorfosis de esta especie. Se propone que la TRH hipotalámica de *A. mexicanum* podría cumplir otras funciones. 2) Se sabe que la T4 ejerce un efecto de retroalimentación positiva sobre las células hipofisiarias productoras de TSH y posiblemente sobre la tiroidea misma. Se considera que los niveles endógenos circulantes de T4 en urodelos neoténicos son insuficientes como para hacer que la hipófisis inicie la liberación de la TSH. A su vez el incremento masivo de T4 podría activar sistemas hipotalámicos que permitirán la acción del factor hipotalámico sobre la hipófisis (88, 123).

Existen evidencias sobre el posible antagonismo entre las hormonas tiroideas y la PRL en el proceso de metamorfosis en anuros (16, 54, 169). Se propone que el incremento inicial de T4 activa los centros hipotalámicos y ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de PRL; activandose así el proceso de metamorfosis (53, 54, 123, 125).

En organismos neoténicos facultativos de la especie *A. tigrinum* la concentración de PRL hipofisiaria es mayor que en los organismos no neoténicos. Sin embargo, al considerar las unidades de concentración por unidad de peso, la diferencia entre organismos neoténicos y no neoténicos, no es significativa (88, 124). Por otro lado en *A. mexicanum*, especie neoténica inducible, se ha demostrado que la administración de PRL no bloquea la liberación TSH-inducida de hormonas tiroideas de la glándula tiroidea en un ensayo in vitro (40).

Grados de Neotenia en Anfibios

Algunos urodelos Vgr., *Proteus anquinus* y *Necturus ssp* son descritos como neoténicos obligados, puesto que tanto en la naturaleza como bajo condiciones experimentales raramente o nunca se metamorfosean. Sin embargo, los extractos de la glándula tiroidea de estas especies pueden inducir metamorfosis en otros anfibios, lo que indica que la ausencia de

metamorfosis en estos urodelos obedece a mecanismos extratiroides; Vgr. inmadurez hipotalamo-hipofisis y/o resistencia periférica a la acción de las tironinas. Otras especies de urodelos, al parecer nunca se metamorfosean en la naturaleza; sin embargo, responden a la administración de hormonas tiroideas. A los organismos de estas especies se les llama neoténicos obligados inducibles. Como ejemplos de esta característica tenemos a Euricea tynerensis y Euricea neotenes, Gynophilus palleucus y Ambystoma mexicanum (88, 154).

Una modalidad más de neotenia en anfibios la constituyen las especies facultativas. En éstas es posible encontrar en un mismo lugar, organismos adultos neoténicos y organismos transformados. Se plantea que la metamorfosis ocurre o no en función de las condiciones medioambientales y endocrinológicas. Un ejemplo claro de esta situación se presenta en algunas poblaciones de A. tigrinum. Se ha observado que cuando estos organismos habitan lagos cálidos, por lo general presentan metamorfosis natural. Sin embargo, cuando permanecen en lagos fríos se trata de adultos neoténicos, que al ser modificadas las condiciones bajo las que se encuentran presentan metamorfosis. Otro planteamiento es que la neotenia en anfibios puede favorecerse cuando los organismos habitan en cuerpos de agua permanente, como en el caso de A. gracile. En contraste, cuando los individuos viven en sitios templados, generalmente presentan metamorfosis temprana, como en A. lateralis (46, 88).

De manera general se ha propuesto que la neotenia en anfibios urodelos puede representar un mecanismo de especiación en el proceso de la evolución (182). Se piensa que la neotenia en anfibios podría estar favorecida no solamente por el frío, sino también por las duras condiciones terrestres comparadas con el medio acuático, así como la menor proporción de depredadores potenciales en el agua (125, 161).

Neotenia Evolutiva

Se propone que la neotenia explica de hecho la mayoría de los cambios evolutivos fundamentales en el reino animal. Se plantea que la evolución de nuevos tipos no ocurre por la adición de nuevos estadios a los adultos ancestrales, sino que normalmente se efectúa por divergencia ontogenética (una forma del desarrollo larvario se ramifica en algún punto del curso evolutivo preexistente). Un nuevo grupo animal no se originaría a partir de un adulto de un grupo anterior, sino de las larvas de éste. Dicha larva en lugar de transformarse en adulto normal, conserva la morfología larvaria y desarrolla órganos sexuales para establecerse como un nuevo tipo de animal adulto. La evolución por la que los tunicados se convirtieron en vertebrados, proporciona un buen ejemplo de neotenia evolutiva. Los tunicados pasan por un estado de larvas libres, provistas de cola y luego se transforman en adultos sésiles; y hoy en día se asume que los vertebrados pudieron haber evolucionado a partir de larvas neoténicas de tunicados. De manera semejante se plantea la posibilidad de que en el hombre el retardo del desarrollo embrionario respecto a otras

especies se tradujo, ante todo, en un alargamiento considerable de la duración de la vida. Nuestra especie es uno de los grupos animales que alcanza mayor longevidad. Todas las fases de su ciclo biológico se alargaron, incluida la del desarrollo postnatal y adolescencia; así se logra un periodo juvenil proporcionalmente muy largo. Un mono antropomorfo (chimpancé) es adulto a los 5 ó 6 años y senil a los 30 años, edad en la que el hombre acaba de alcanzar la madurez. Con ello el hombre dispone de más tiempo para aprender y almacenar experiencias, características de la especie humana (182).

3. ENCEFALINAS

3.1. Encefalinas en Mamíferos

Como parte de la práctica médica, desde el siglo XIX se ha utilizado a la morfina por sus efectos analgésicos. Sin embargo es hasta el presente siglo que se consiguen las evidencias sobre la acción de la morfina y otros opiáceos a través de receptores específicos. Al observar que solamente la forma levorrotatoria de una mezcla racémica de alcaloides opiáceos producía los efectos analgésicos (60); se sugirió la existencia de sitios de unión estereoespecíficos para los opiáceos. En 1973, diferentes grupos de investigación demostraron bioquímicamente la existencia de sitios de unión estereoespecíficos en membranas de células nerviosas (130, 155).

La demostración de la existencia de receptores estereoespecíficos para los opiáceos en el sistema nervioso de mamíferos (130) permitió considerar la existencia de substancias endógenas con acciones semejantes a las de la morfina. Hughes y col (1975) demostraron que en los extractos cerebrales de cerdo existían compuestos de naturaleza peptídica, semejantes a la morfina en cuanto a su acción farmacológica. Desde este momento este grupo de investigación los denominó encefalinas, dada su ubicación en la cabeza (76). Ese mismo año, estos investigadores purificaron y determinaron la secuencia de aminoácidos correspondiente. Sus resultados indicaron que se trataba de dos péptidos, cada uno con 5 aminoácidos, con las siguientes secuencias: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met y Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu y las llamo Metionina-encefalina (ME) y Leucina-encefalina (LE) respectivamente (77).

A partir de los primeros resultados sobre la existencia de receptores a opiáceos que se confirma en estudios posteriores y en base a diversos estudios farmacológicos con diferentes ligandos opiáceos (103, 107) se demostró que los receptores a opiáceos existen en diferentes formas (129, 130).

Inicialmente se reconocieron los receptores μ , κ , y σ , cuyos nombres se asignaron en base a la unión de los opiáceos que permitieron distinguirlos. Se designó μ a los sitios cuyo agonista era la morfina, κ los de ketocyclazocina y σ a los sitios cuyo agonista fue la N-allylnormetazocina (SKF-10047) (107). Otro receptor, por el hecho de ser el receptor predominante en el vas deferens de ratón, fue designado delta (103).

Estudios posteriores demostraron que el receptor sigma no muestra la estereoespecificidad característica de un receptor opiáceo (3) y la mayoría de los efectos conductuales de los agonistas no se revierten con naloxona o naltrexona (dos antagonistas de los receptores a opiáceos) (73, 129).

Después del descubrimiento de las encefalinas (ENKs) se han descrito muchos otros péptidos opioides, cada uno de los cuales contiene en su secuencia al menos una copia de alguna de las ENKs. Todos estos péptidos en conjunto con las ENKs se denominan péptidos opioides (opiáceos endógenos) y se ha demostrado que se generan a partir del procesamiento posttraducciona de tres proteínas precursoras de alto peso molecular: la proopiomelanocortina (POMC), la proencefalina (PEF) y la prodinorfina (PDNF) (74, 173, 183). La generación de los péptidos bioactivos, dentro de cada precursor esta señalada por la presencia de pares de aminoácidos básicos que los limitan (98, 173). (Fig. 4).

A partir de la POMC se generan varios péptidos bioactivos (ACTH, gamma-, alfa-MSH, beta-lipotropina, beta-endorfina) de los cuales sólo la beta-endorfina y sus derivados de menor peso molecular (alfa- y gamma-endorfina) son de naturaleza opioide. Los primeros 5 aminoácidos de la región amino terminal de la beta-endorfina (61-65) corresponden a la secuencia de la ME, por lo cual en un principio se pensó que el precursor de la ME era la POMC, sin embargo se demostró que la ME no se produce como un producto final a partir de este precursor (73, 75, 110).

Todos los péptidos generados a partir de la PEF son de naturaleza opioide. Este precursor contiene en su secuencia a las dos ENKs; 6 secuencias de ME y una secuencia de LE. La secuencia de LE (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) y cuatro secuencias de ME (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) se liberan del precursor como productos finales. Las otras dos secuencias de ME forman parte de otros dos péptidos bioactivos; el heptapéptido (HE: ME-Arg-Phe) y el octapéptido (OC: ME-Arg-Gly-Leu) (171). Adicionalmente, a partir de la PEF se generan muchos otros péptidos opioides, como el péptido E, el F, BAM, etc., (74, 75, 98, 173).

La PDNF contiene tres secuencias de LE y ninguna de ME; y al igual que la PEF todos sus productos son de naturaleza opioide. Todos los productos provenientes de la PDNF presentan en su extremo amino terminal la secuencia de LE. Al parecer la LE no es uno de los principales productos finales de la PDNF, sino más bien forma parte de péptidos más grandes, como la alfa- y beta-neo-endorfina, la dinorfina 1-13 y la dinorfina 1-17 (73), aunque en algunos tejidos y especies animales, no se descarta la posibilidad de que la LE provenga de la PDNF (73, 152, 187).

Las afinidades de los diferentes péptidos opioides para los receptores son variables; la beta-endorfina es equipotente a receptores mu y delta; las ENKs son agonistas para los receptores delta y las dinorfinas son agonistas kappa (73, 129).

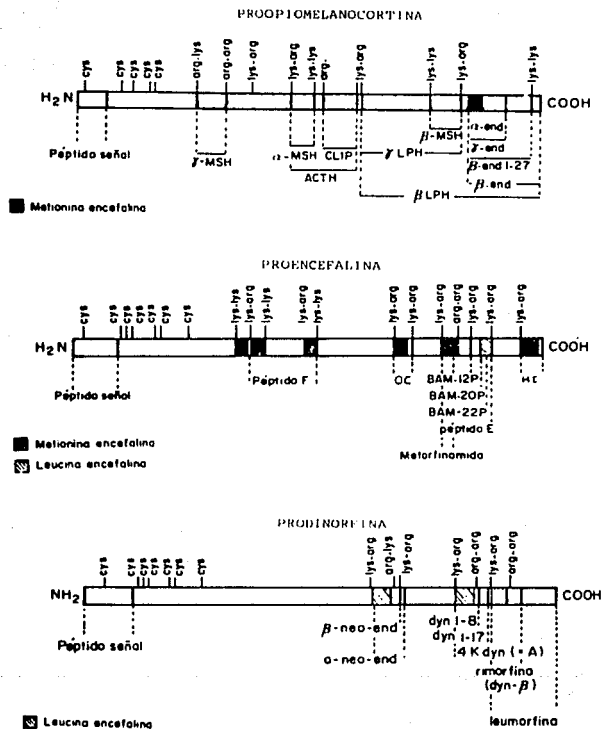


FIGURA 4. Precursores de los péptidos opioides. Se señalan los principales productos bioactivos resultantes en cada precursor. Obsérvese el alto grado de homología que comparten en cuanto a su estructura general.

3.2. Posibles Implicaciones Fisiológicas de las Encefalinas

Las ENKs han sido implicadas con la regulación de funciones endocrinas, autonómicas y nociceptivas (23, 75, 107, 111). La identificación inicial de las ENKs fue en tejido nervioso y posteriormente, su presencia se ha descrito en múltiples tejidos. Por ejemplo en la médula adrenal (101), en el páncreas y en el pulmón (148); en el corazón (179) y en el sistema inmune de mamíferos (135).

Se acepta de manera general que las ENKs ejercen sus acciones como neurotransmisores (55, 74, 75, 109), neuromoduladores o neurohormonas (13, 50, 174, 186) a través de su unión con los receptores a opiáceos (47, 109) y que la modalidad de su acción va a depender en gran medida de la clase de tejido en que se encuentren (110). Incluso se considera que las acciones fisiológicas de los péptidos opioides en general, en la mayoría de los casos son secundarias a la disminución en la liberación y en la tasa de disparo de otro neurotransmisor es decir que su principal acción es como neuromoduladores (121).

La distribución de las ENKs dentro del SNC, generalmente se asocia con la distribución de los sitios receptores a opiáceos (55, 74, 75, 109). En el SNC de mamíferos, una de las áreas con mayor concentración de ENKs corresponde al *globus pallidus* y *nucleus accumbens*. El significado preciso de elevadas concentraciones de ENKs en esta región no es claro, sin embargo se ha planteado que es razonable esperar que las ENKs estén involucradas en el control extrapiramidal de la actividad motora. Se sabe que muchos péptidos opioides pueden producir hipermovilidad o tener efectos catalepticos (110).

Por la localización de las ENKs así como de los receptores a opiáceos en regiones cerebrales que se sabe intervienen en el control de la función del dolor y en base a los efectos analgésicos de las ENKs, se considera que estas participan en los procesos nociceptivos (81, 86, 116).

Por la existencia de terminales encefalinérgicas en la capa externa de la eminencia media y el hecho de que la administración de las ENKs es capaz de estimular la liberación de algunas hormonas hipofisarias, como: PRL, hormona del crecimiento (GH) y VSP (26, 35, 99, 153, 174) a la vez que pueden disminuir los niveles de LH y el cortisol (26, 165) y controlar la secreción de oxitocina (OXT) (108, 167), se considera que las ENKs podrían jugar un papel importante como moduladores neuroendocrinos.

A la fecha no es claro si los efectos de las ENKs sobre las hormonas hipofisarias son directos o mediados vía hipotálamo. Se ha demostrado que la naltrexona (un antagonista opiáceo) inhibe la secreción de PRL en ratas con deafferentación hipotalámica, pero no de la hipófisis aislada *in vitro* (63), lo que indica que el sitio de acción de los sistemas opioides es muy probablemente el hipotálamo (7).

En una preparación *in vitro* la D-Ala-LE (análogo de la LE, protegido de la acción encefalinasa) inhibe la liberación calcio dependiente de VSP producida por estimulación eléctrica del tallo hipofisario de la rata, efecto revertido por la naloxona (79). Del mismo modo se ha considerado la participación

de las ENKs en la función cardiovascular; se plantea que su función en este sistema podría estar mediada por la disminución de los niveles de la VSP (138).

También se sugiere la participación de las ENKs en la regulación de los ciclos biológicos de algunas especies. Por ejemplo en la ardilla que hiberna (Citellus suslicus); en donde la concentración cerebral de ME es mayor durante la época de hibernación en comparación con la temporada de actividad. Se considera probable la participación de los sistemas encefalinérgicos en la inducción del sueño de verano en esta especie (87).

3.3. Encefalinas en los Anfibios

Las ENKs y el HE, se han identificado en el cerebro de Bufo marinus mediante radioinmunoanálisis (RIA) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En el mismo estudio se aportan evidencias que sugieren la existencia de un precursor de las ENKs semejante a la PEF de mamíferos (84). En otro anfibio, Rana esculenta, se identificó IR-ME en los cuerpos celulares del asta dorsal de la médula espinal mediante inmunohistoquímica (IHQ) (102).

Por medio de IHQ se determinó la presencia de IR-LE en las células amácrinas de larvas de A. tigrinum. La IR-ENKs se observó principalmente en las células amácrinas de la capa nuclear interna y la capa de células ganglionares. Las células con IR-ENKs se observaron en posición pre y postsináptica a otras células amácrinas no encefalinérgicas de la capa plexiforme interna (178). Con la misma técnica se ha demostrado la presencia de IR-LE e IR-ME en algunas fibras de la eminencia media, el lóbulo neural y el lóbulo anterior de la hipófisis de A. mexicanum (96). Mediante la cuantificación por RIA se han identificado diferencias regionales en la concentración de IR-ME e IR-LE en el cerebro y la hipófisis de A. mexicanum (11, 29) y A. tigrinum (30).

La presencia de ENKs también se ha reportado en otros tejidos de anfibios. En las fibras nerviosas que inervan el tracto gastrointestinal de A. mexicanum se detectó IR-ME mediante IHQ (27). En las células cromafines de la glándula adrenal de Rana ridibunda se determinó IR-ME mediante IHQ y RIA, observándose que coexisten con el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (95). Leboulenger y Col. también proponen que en los anfibios podría existir una molécula precursora semejante a la PEF de mamíferos, ya que detectan IR para la synenkephalin (región amino terminal, característica de la PEF de mamíferos) en las células cromafines de Rana ridibunda (93).

En los diferentes tejidos de mamíferos, dos péptidos característicos de la PEF están presentes generalmente en cantidades equimolares; se trata del HE y el OC (34, 74). Sin embargo, en anfibios (84, 94), se ha detectado IR-HE, pero no el OC; lo que ha llevado a proponer que el precursor de estos péptidos en anfibios podría ser distinto al de mamíferos.

De hecho la secuencia nucleótida del gen que codifica para la PEF se determinó en un anfibio; Xenopus laevis.

observándose que se trata de una proteína que guarda un alto grado de homología con la PEF de mamíferos (106). Sin embargo, presenta algunas diferencias importantes en relación a las ENKs y el OC. La molécula de PEF en Xenopus laevis contiene 5 copias de ME, ninguna de LE, una copia de HE y en la posición correspondiente al OC dentro del precursor, se encuentra la siguiente secuencia, ME-Arg-Gly-Tyr ; que solo difiere del OC de mamíferos en el último aminoácido, que es Tyr y no Leu (Fig. 5).

La PEF en Xenopus laevis no contiene la secuencia de LE, sin embargo, en el cerebro de Bufo marinus (84), en el encéfalo y la hipófisis de A. mexicanum (11, 29, 96) y A. tigrinum (30) se ha demostrado la presencia de LE. Por lo que se considera factible que en anfibios la LE podría provenir de un precursor distinto a la PEF, por ejemplo la PDF (100, 152).

En algunos tejidos de mamíferos se considera que la LE podría tener un doble origen: a partir de la PEF y a partir de la PDNF (179, 187). La posibilidad de que en anfibios exista una molécula precursora semejante a la PDNF, a partir de la cual pueda generarse la LE se robustece por la identificación de IR para péptidos derivados de la PDNF en el sistema nervioso e hipófisis de Bufo marinus (37) y por la identificación y cuantificación de los niveles cerebrales de dinorfina 1-8 y 1-17 en Xenopus laevis (152).

3.3 Encefalinas en otros Vertebrados e Invertebrados

Con el objeto de no hacer más extensa esta sección, la información referente a otros vertebrados e invertebrados se resume en las tablas 1 y 2.

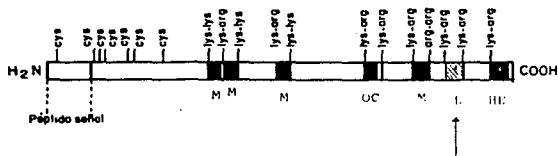
Se sabe de la existencia de receptores a opiáceos en el sistema nervioso de todos los vertebrados examinados (48), y en algunos invertebrados (162). Este hecho asociado a la identificación de péptidos opioides endógenos en los diferentes grupos en la escala filogenética ha llevado a especular sobre el significado fisiológico de los sistemas opioides endógenos a través de la evolución. No obstante el cúmulo de evidencias, se trata aún de datos aislados y parciales que sólo tomarán sentido con futuras investigaciones. Por el momento en esta tesis solamente se mencionaran las evidencias que sugieren relaciones funcionales en diferentes especies no mamíferas en relación a las ENKs, sin abordar a los otros sistemas de péptidos opioides.

Diferentes estudios realizados en aves (139, 166), reptiles (49) y anfibios (178) han aportado evidencias que sugieren posibles interacciones de las ENKs con otros sistemas neurotransmisores específicos. En la retina de pollo, las ENKs coexisten con GABA en algunas poblaciones de células amácrinas (178). Otro estudio demuestra que las ENKs inhiben la liberación potasio-inducida de dopamina y GABA en la retina de pollo (166).

Las células amácrinas de la retina de tortuga contienen ENKs además de otros neurotransmisores y estas células envían estímulos sinápticos a células bipolares ganglionares y posiblemente a otras células amácrinas (49).

La localización de las ENKs en la retina de larvas de A. tigrinum ha hecho sugerir que en anfibios, como ocurre en aves y

PROENCEFALINA EN MAMÍFEROS



- M=Met-enkefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (ME) (4)
 OC=Octapéptido: ME-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ (1)
 L=Leu-enkefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (1)
 HE=Heptapéptido: ME-Arg⁶-Phe⁷ (1)

PROENCEFALINA EN *Xenopus laevis*



- M=Met-enkefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (ME) (5)
 OC=Octapéptido: ME-Arg⁶-Gly⁷-Tyr⁸ (1)
 L=Leu-enkefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (0)
 HE=Heptapéptido: ME-Arg⁶-Phe⁷ (1)

FIGURA 5. Comparación de la Proencefalina de mamíferos con la de un anfibio (*Xenopus laevis*). Se anota el lugar que ocupan las encefalinas, así como el hepta y octapéptido.

TABLA 1. IR-ENKs en algunas especies de Protocordados e Invertebrados.

TEJIDO	ESPECIE	ENKs	TEC.	REF.
PROTOCOLDADOS				
SN y Ovarios	<u>Ciana intestinalis</u>	IR-ME	IHQ	58
Organismo completo	<u>Ciana intestinalis</u>	IR-ME	RIA	132
INVERTEBRADOS				
<u>Insectos</u>				
Corpora cardiaca	<u>Lacusta migratoria</u>	IR-ME	IHQ	141
SN	<u>Eristalis</u>	IR-ME	IHQ	140
<u>Crustáceos</u>				
Tallo óptico, retina	<u>Panularis interruptus</u>	IR-LE	IHQ	105
SN	<u>Carcinus maenas</u>	IR-ME	RIA	132
Tallo óptico		IR-LE		
Organo neurohemal	<u>Carcinus maenas</u>	IR-ME	IHQ	83
<u>Anélidos</u>				
SN	<u>Lumbricus terrestris</u>	IR-LE	IHQ	6
SN, vesícula seminal	<u>Lumbricus terrestris</u>	IR-ME	RIA	145
SN	<u>Hirudo medicinalis</u>	IR-ME	IHQ	188
				92
<u>Platelmintos</u>				
SN	<u>Planaria</u>	IR-ME	IHQ	176
			RIA	
<u>Moluscos</u>				
Organo neurohemal	<u>Octopus vulgaris</u>	IR-ME	IHQ	140
SN	<u>Metylus edulis</u>	IR-ME	RIA	97
		IR-LE	HPLC	
SN	<u>Helix aspersa</u>	IR-ME	RIA	70
		IR-LE		

Para mayor información sobre péptidos opioides en invertebrados consultar: Greenberg and Price, 1983; Picolli et al., 1985. SN= Sistema nervioso, TEC= técnica, Ref= referencia.

TABLA 2. IR-ENKs en Diferentes Especies de Peces, Reptiles y Aves.

TEJIDO	ESPECIE	ENKS	TEC.	REF.
<i>PECES</i>				
Cerebro	Peces teleósteos	IR-ME	IHQ	137
	Goldfish	ME	A.I	146
<i>AVES</i>				
Retina	Pollo y Paloma	IR-ME	IHQ	23
Cél. amácrinas y sus procesos		IR-LE	IHQ	
Cerebro anterior	Paloma	IR-ME	IHQ y RIA	15
Telencéfalo	Pollo	IR-ENKs	IHQ	139
<i>REPTILES</i>				
Cerebro completo	Tortuga, Lagarto, Lagartija	IR-ME, IR-LE, IR-HE y IR-OC	HPLC y RIA	100
Telencéfalo	Caiman	IR-ENKs	IHQ	22
Cerebro	Tortuga	IR-ENKs	IHQ	118
	Lagarto	IR-ENKs	IHQ	
Médula espinal	Lagarto	IR-ENKs	IHQ	184
Retina	Tortuga	IR-ENKs	IHQ-Peroxidasa	49

ENKs=enkefalinas, TEC=técnica, REF=referencia. Cél.=células, A.I=administración intracraneal.

reptiles, las ENKs coexistan con otros sistemas de neurotransmisores y contribuyen en la integración de la información visual (178).

En invertebrados, las ENKs también se han relacionado con la actividad visual; particularmente en el sistema de fotorrecepción de crustáceos (83, 105).

Por otro lado en el telencéfalo de reptiles la mayor IR-ENKs corresponde al área ventrolateral (22, 118), donde la concentración de catecolaminas, acetilcolinesterasa y substancia P es mayor (22). Lo que sugiere la similitud de distribución de las ENKs en asociación a otros neurotransmisores en el telencéfalo de reptiles, aves y mamíferos, con lo reportado en aves y mamíferos. Lo que permite plantear que muchas de estas vías, como las de catecolaminas y substancia P, se formaron en momentos iniciales de la evolución de los amniotas y han permanecido en las especies vivientes de estas clases de vertebrados (22).

Se ha planteado la posibilidad de que en los anfibios las ENKs participen en los procesos de esteroidogénesis al interactuar con el VIP y las catecolaminas (95). En este grupo de vertebrados la participación de los péptidos opioides en la regulación de la actividad locomotora (43) y de los sistemas de péptidos opioides endógenos en el procesamiento central de la información nociceptiva (131, 163) también se ha evidenciado.

En peces, las ENKs se han relacionado con la regulación del comportamiento de desplazamiento hacia la superficie (surfacing) en asociación con la melatonina (146).

La presencia de IR-ME en neuronas y fibras nerviosas durante el desarrollo temprano de un protocordado hace sugerir la posible relación de la ME neural durante la oogenesis de Ciana intestinales; ya que la concentración de IR-ME en ganglios nerviosos y ovarios antes y durante la estación de desove es mayor (58).

La interacción de las ENKs con el sistema dopaminérgico se ha propuesto en moluscos (162) y en anélidos (176). En Mytilus edulis se ha evidenciado la presencia de receptores a opiáceos mediante la unión estereoespecífica de opiáceos. En esta misma especie la ME incrementa los niveles de dopamina (162). Por otro lado, en planaria se demostró la presencia de ENKs y que la morfina disminuye los niveles de AMPc así como el contenido de dopamina (176).

4. ANTECEDENTES INMEDIATOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La identificación de las ENKs en el cerebro de anfibios anuros (84) y urodelos (11, 29, 30, 96, 178); las diferencias regionales en su concentración, principalmente entre las regiones cerebrales y la hipófisis (29, 30); así como las evidencias sobre la existencia de receptores opioides en el SN de los anfibios (156), son aspectos que permiten considerar que las ENKs podrían jugar algún papel en la fisiología de estos vertebrados. Sin embargo, al igual que para otros animales, el papel fisiológico de las ENKs en anfibios se desconoce.

Por otro lado, se sabe que durante el ciclo de vida de los anfibios, la metamorfosis es uno de los procesos fisiológicos más

importantes y que depende de mecanismos neuroendocrinos. Considerar el estudio de las ENKs en diferentes condiciones fisiológicas, como las etapas de la metamorfosis en anfibios, podría proporcionar información sobre el papel de las ENKs en su fisiología.

Por la importancia de esta especie, desde el punto de vista biológico, por sus características de desarrollo con las potencialidades que brinda como animal de experimentación, aunado a la imposibilidad de obtener el material biológico de manera constante desde su habitat; la presente tesis se enmarca en un proyecto global sobre la biología del desarrollo de A. mexicanum y las ENKs. En primer lugar fue necesario abordar los aspectos en relación a su reproducción en condiciones de laboratorio, con el objeto de formar una colonia. Esto permitiría conocer la biología de su desarrollo y al lograr su reproducción en cautiverio, se contaría con el material biológico necesario y por tratarse de una especie en peligro de extinción. Los conocimientos adquiridos sobre su ciclo de vida en cautiverio funcionarían como una guía en el establecimiento de medidas encaminadas a su preservación (Anexo I).

Un segundo aspecto, se desprende de las características intrínsecas de la especie; la posibilidad de inducir la metamorfosis y analizar el proceso de manera controlada. En vista de la poca información sobre la forma de inducir metamorfosis y reconocer sus etapas en los anfibios urodelos (90, 122), en particular el A. mexicanum fue necesario determinar en forma precisa y confiable el método de inducción de la metamorfosis, así como el reconocimiento de sus etapas en la especie de nuestro interés (Anexo II).

Una vez cubiertos estos aspectos básicos, se abordó el objetivo central de la tesis a partir de las siguientes bases:

1. Se sabe que la metamorfosis en anfibios depende de una regulación neuroendocrina, en la que participan la unidad hipotálamo-hipofisis y la glándula tiroides.

2. En los organismos neoténicos como A. mexicanum este mecanismo parece ser selectivo, ya que por una parte permite el desarrollo de las funciones reproductivas y por el otro, bloquea la metamorfosis. Se ha sugerido que este bloqueo podría localizarse en cualquiera de los tres niveles del sistema (cerebro, hipofisis o tiroides). La mayoría de las evidencias apoyan la hipótesis de que el bloqueo se encuentra a nivel hipotalámico; puesto que: 1) la glándula tiroides de A. mexicanum es funcional y responde a estímulos de TSH; 2) su hipofisis contiene células y proteínas con actividad tirotrópica; 3) aunque el hipotálamo de A. mexicanum contiene cantidades razonables de TRH, la inyección del tripéptido no estimula la metamorfosis en esta especie. Además se hipotetiza la participación de la PRL como promotor de la neotenia y de un factor hipotalámico inhibidor de su secreción como activador de la metamorfosis.

3. Ambystoma mexicanum es una especie neoténica que en su medio natural no presenta metamorfosis; sin embargo, sus tejidos periféricos son sensibles a las hormonas tiroideas administradas de manera experimental. Esta activación de los mecanismos endógenos de la metamorfosis mediante la administración de hormonas tiroideas, permite analizar temporalmente el proceso de una manera controlada; al conocer el tipo y cantidad de estímulo, así como el momento de inicio.

4. Existen ENKs en el sistema nervioso y la hipófisis de anfibios tanto anuros como urodelos. En el caso de urodelos hemos observado diferencias regionales significativas en la concentración de las ENKs, principalmente entre la hipófisis y las regiones cerebrales.

5. En mamíferos se ha establecido una interacción entre las ENKs y diferentes hormonas (PRL, GH, VSP, LH, TSH y OXT).

6. Se ha planteado que la PRL ejerce un efecto inhibitorio sobre la metamorfosis en anfibios, mientras que la OXT y VSP la fomentan.

Una de las principales interrogantes ante la identificación de las ENKs en SNC e hipófisis de A. mexicanum durante nuestra investigación fue, cuál podría ser el significado de tales neuropéptidos en la fisiología de la especie. En un estudio previo, demostramos diferencias significativas en la concentración de las ENKs el diencefalo-mesencefalo de A. tigrinum entre organismos metamorfoseados y no metamorfoseados (30). Con estos resultados, aunados a la serie de evidencias que aquí se presentan, resultaba coherente pensar que la presencia de las ENKs en estos tejidos podría tener alguna relación con la metamorfosis en anfibios.

A. tigrinum presenta metamorfosis espontánea y es una especie que puede conseguirse con relativa facilidad desde su habitat; sin embargo, un gran inconveniente es que al presentar metamorfosis espontánea no siempre es posible sincronizar los grupos experimentales, al provenir del campo no es posible conocer las condiciones bajo las cuales se han desarrollado. Por otro lado se sabe que los cambios neuroendocrinos de la metamorfosis en anfibios se observan en la parte intermedia del proceso.

Por tales razones, aprovechando las ventajas que brinda A. mexicanum para estudiar la metamorfosis de una manera controlada y con el propósito de hacer una primera aproximación a la pregunta planteada; en la presente tesis se cuantifico la concentración de las ENKs en cuatro regiones encefálicas y la glándula hipófisis durante las diferentes etapas de la metamorfosis inducida con T4 en este anfibio. Mediante un método estandarizado para la identificación de las etapas metamórficas en una población de A. mexicanum que se desarrollo bajo condiciones controladas.

5. HIPOTESIS

Durante la metamorfosis de anfibios se presentan cambios temporales en la secreción de diferentes mensajeros químicos en el SNC y la glándula hipófisis. Si las encefalinas cerebrales e hipofisarias en Ambystoma mexicanum tienen alguna relación con la metamorfosis; ya sea como una causa o como un efecto, entonces su concentración cambiaría a través de las diferentes etapas de este proceso, probablemente en asociación a los mensajeros químicos que participan en la metamorfosis y/o en la regulación de la neotenia de esta especie.

6. MATERIAL Y METODOS

Establecimiento de la Colonia de Ambystoma mexicanum

Lograr la reproducción y mantenimiento de A. mexicanum en cautiverio brindó las siguientes ventajas: a) Conocer la biología del desarrollo de la especie bajo condiciones controladas b) asegurar el aprovisionamiento de material biológico, c) conocer con certeza la edad y características de desarrollo de los organismos.

A finales de 1988 se inicio el trabajo en este sentido. Se recolectaron ejemplares adultos de ambos sexos de A. mexicanum desde los canales de Xochimilco. La reproducción en cautiverio se logró en los periodos reproductivos 88-89 y 89-90, con una mayor población en el segundo. Con el propósito de centrarnos en el objetivo principal de la tesis sin soslayar la importancia de la colonia como uno de los objetivos y logros durante las actividades de la maestría, en el apéndice, (anexo I) se describen los detalles sobre la formación de la colonia de A. mexicanum en condiciones de laboratorio.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Material Biológico

Se utilizaron 36 organismos adultos de ambos sexos de A. mexicanum provenientes de nuestra colonia. Todos los animales tenían un año y medio de edad. La longitud y el peso corporal promedio oscilaron entre 20-22 cm y 80-100 g respectivamente.

Se mantuvo a los organismos en peceras con solución Holtfreter al 20 % y un sistema de aireación de agua a una temperatura de 18 a 20°C. El ciclo de luz obscuridad fue de 12:12 horas. El periodo de luz comenzó a las 7 A.M.

Metamorfosis T4-Inducida

Como ya se menciona la información disponible acerca de la metamorfosis inducida en anfibios urodelos es escasa e incierta (90, 122, 123). Por tal razón, en primer lugar se analizó la dosis, frecuencia y vía de administración óptimas

para definir las etapas de la metamorfosis en A. mexicanum. Los resultados correspondientes se presentan en el anexo II. En esta sección solo se describe el procedimiento con la estrategia que resultó ser la óptima para inducir la metamorfosis y reconocer sus etapas de manera precisa.

a) Marcaje y Formación de Grupos: Con el objeto de reconocer de manera individual a los animales a lo largo del estudio, se marcó cada uno mediante la colocación de un collar de hilo de algodón con colores diferentes. El collar se colocó en torno al cuello, justo por detrás de las branquias (consultar anexo II).

De manera global se formaron 3 grupos: un grupo control inicial, sin metamorfosis (C1) y otro control de manipulación (Cm), cada uno (n=6) se colocó en peceras separadas. El grupo experimental se conformó con 24 animales. A partir de este grupo se formaron los 4 grupos representantes de las etapas de metamorfosis (I, II, III, IV). Los organismos experimentales se repartieron en 6 peceras.

b) Administración de la Hormona: En base al primer estudio (consultese anexo II), los organismos experimentales recibieron una sola inyección intraperitoneal (ip) de L-tiroxina (T4) a una dosis de 2.5 microgramos/g en un volumen de 100 a 200 microlitros de solución Ringer para anfibios. El volumen se ajustó en relación al peso corporal.

El grupo C1 corresponde a organismos que recibieron una inyección ip con el volumen equivalente de solución Ringer para anfibios y se sacrificaron el día cero (día en que se aplicó el estímulo hormonal a los experimentales). Los animales del grupo Cm recibieron una inyección ip de solución Ringer con un volumen equivalente el día cero; se manipularon igual que los experimentales y se sacrificaron cuando la finalizó la metamorfosis de los experimentales (25 días postestímulo).

c) Reconocimiento de las Etapas de Metamorfosis: Los criterios que se utilizaron para reconocer las diferentes etapas de la metamorfosis resultaron de la combinación de nuestro estudio inicial (anexo II) y el de Norman, 1985; con algunas modificaciones. En la tabla 3 se resumen estos criterios y se comparan con los equivalentes en A. tigrinum descritos por Norman, (122) y Carr y Norris, (33). Los criterios principales fueron el porcentaje de reducción en la longitud de branquias (LBR) y las proporciones entre el ancho de las aletas ventral (AAV) y dorsal, (AAD) así como los de la aleta dorsal respecto al ancho total de la cola. En la Fig. 6 se señalan los puntos de referencia para efectuar las mediciones en el cuerpo del animal.

Obtención de los Tejidos

Los animales se sacrificaron por decapitación. Los organismos de los grupos C1 y Cm se sacrificaron el día 0 y 25 respectivamente. El sacrificio en los grupos experimentales se efectuó en el momento que cada 6 organismos alcanzaron el

TABLE 3. Etapas de la Metamorfosis en Anfibios Urodelos:
Criterios y Equivalencias.

Otros Autores*	Este Estudio
<u>Ambystoma tigrinum</u>	<u>Ambystoma mexicanum</u>
I. Aleta ventral/aleta dorsal x 100. igual o mayor a 40.	C1. Longitud branquias 100%. Aleta ventral/aleta dorsal x 100 igual o mayor a 40.
II. Aleta ventral/aleta dorsal x 100 = 25.	I. Longitud branquias 85 a 75%. Aleta ventral/aleta dorsal x 100= 25 a 10.
III. Aleta ventral/aleta dorsal x 100 = 10.	
IV. Aleta ventral = 0.	II. Longitud branquias 50%. Aleta ventral = 0.
V. Aleta dorsal/ancho cola x 100 = 25.	III. Longitud branquias 25%. Aleta dorsal/ancho cola x 100=25 a 10.
VI. Aleta dorsal/ancho cola x 100 = 10.	
VII. Longitud branquias 0%.	IV. Longitud branquias 0-3%.

* = Estos criterios corresponden a los descritos por Norman, 1985 y Carr y Norris, 1988. La etapa I del presente estudio incluye a las etapas II y III de Norman. Las etapas II y IV corresponden a las VI y VII de ese mismo autor respectivamente, y la etapa III de nosotros incluye a las etapas V y VI de Norman.

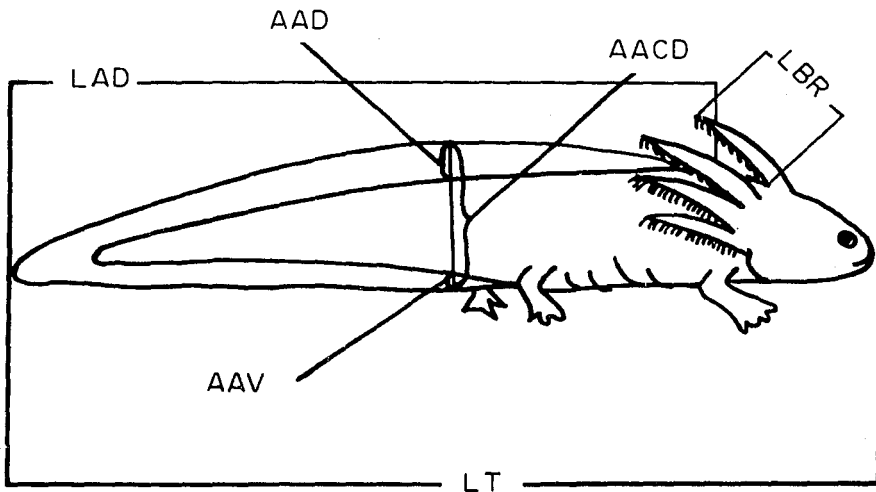


FIGURA 6. Indicación de las regiones corporales al nivel que se efectuaron las mediciones de los parámetros morfométricos. Se considero la longitud de las branquias intermedia tanto izquierda como derecha. Para realizar la medición se extendió a las branquias su punto de origen, justo donde hace angulo con la branquia inferior, hasta la punta del raquis, sin considerar la extensión de los filamentos. Los puntos de referencia para otros parámetros se indican en el esquema. AAD=ancho aleta dorsal, AACD= ancho aleta caudo-dorsal, AAV=ancho aleta ventral, LT=longitud total, LBR=longitud de branquias.

porcentaje de reducción en los parámetros morfométricos señalados para cada etapa de la metamorfosis (tabla 3).

La obtención de la hipófisis y el cerebro se efectuó sobre una superficie fría, se eliminó la musculatura y huesos del cráneo y se extrajo el tejido, cortando cuidadosamente los nervios craneales. La disección de las regiones cerebrales y la hipófisis se hizo en base a los estudios descritos por Herrick (71) y Opdman y Niewenhays (127). (Fig. 7).

Se separaron las siguientes regiones cerebrales: telencefalo, diencefalo, mesencefalo y rombencefalo. También se separó la hipófisis completa y se colectó la sangre desde el tallo corporal.

Purificación de las Encefalinas

Al término de la disección cada estructura se pesó e incubó en cinco volúmenes de HCl 0.1 N, durante 15 min a 95°C. Cada muestra se homogeneizó con un pistilo de teflón a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min y se centrifugó a 20 000 rpm a 4°C, 1h. Las ENKs se purificaron a partir del sobrenadante mediante cromatografía de adsorción en amberlita XAD-2 de acuerdo al método de Smith et al., 1976 y Vindrola et al., 1981. Se utilizaron columnas de vidrio (0.5 x 11 cm). El lecho de amberlita fue de 8 cm. La velocidad de corrimiento fue de 0.5 ml/min. Con dos lavados, el primero con 20 ml de HCl 0.1 N y el segundo con 40 ml de agua destilada. La elución se efectuó con 20 ml de metanol absoluto. Los eluatos se evaporaron a sequedad en baño maría y se rehidrataron con 1 ml de agua destilada.

Obtención de Antisueros Anti-Encefalinas

Los antisueros Anti-encefalinas utilizados en este estudio se obtuvieron mediante al método descrito por Vindrola et al., (177). El antígeno (ME, LE) acoplado con glutaraldehído a BSA y mezclado con adyuvante completo de Freud, se inoculó por vía subcutánea en conejos de la cepa Nueva Zelanda. Se efectuaron inyecciones de refuerzo cada mes. A partir del primer mes se efectuaron sangrados para medir los títulos en el suero. La valoración se hizo mensualmente hasta encontrar una unión de de 30%. Entonces se sangró completamente al conejo correspondiente para obtener el suero, mismo que se guardó en congelación en alícuotas de 1 ml. Los valores de reacción cruzada para los antisueros se resumen en la Tabla 4.

Iodación de Encefalinas

La iodación de las ENKs se efectuó mediante el método de cloramina T descrito por Gros, (66); con algunas modificaciones. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Disolver 2 microgramos de antígeno (ME o LE) en 10 microlitros de amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 7.4.
2. Agregar 200 micro ci de I125

Cerebro de
Ambystoma mexicanum

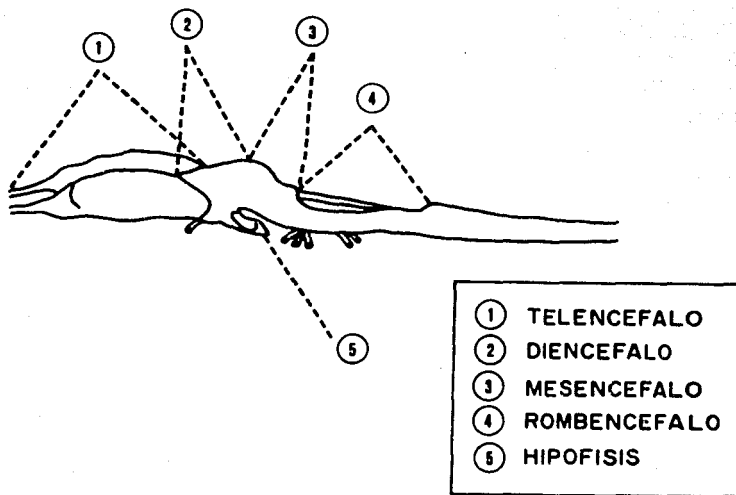


FIGURA 7. Cerebro de Ambystoma mexicanum. Se señala el nivel al cual se efectuaron los cortes para separar las regiones. 1= telencéfalo, 2= diencéfalo, 3= mesencéfalo, 4= rombencéfalo, 5= hipófisis.

TABLA 4. Porcentajes de Reacción Cruzada con Péptidos semejantes a las ENKs con los antisueros Anti-ENKs.

Anti-ME		Anti-LE	
Péptido	%	Péptido	%
ME(O)	100.0	LE	100.00
LE	0.01	ME	3.83
ME-Arg	0.76	ME(O)	<0.01
ME-Arg-Phe	0.59	LE-Arg	4.33
ME-Arg-Gly-Leu	0.01	ME-Arg	0.53
LE-Arg	<0.01	ME-Arg-Phe	0.37
Dinorfina 1-8	<0.01	ME-Arg-Gly-Leu	<0.01
		Dinorfina 1-8	<0.01

3. Adicionar 6 microgramos de cloramina T en 4 microlitros de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.4.

4. AGITAR DURANTE 30 SEGUNDOS

5. Detener la reacción mediante la adición de 30 microgramos de metabisulfito de sodio en 4 microlitros de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.4.

6. Agregar 40 microlitros de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.4 para completar un volumen total de 60 microlitros. Tomar una alícuota de 5 microlitros para cuantificar la radioactividad total en la reacción.

7. Purificar ME-I y LE-I mediante cromatografía en placa (cromatofolios AL de silicagel 60 F254, 20x20 cm) en el sistema de solventes: n-butanol: ácido acético: agua, (4:1:1). Las bandas radiactivas se revelan mediante autoradiografía y las correspondientes a las ENKs monoiodadas se extraen en base los valores de los r_f de cada una.

8. Repurificación: para eliminar contaminantes en los productos extraídos, estos se repurifican mediante cromatografía de placa fina, igual que en el inciso 6.

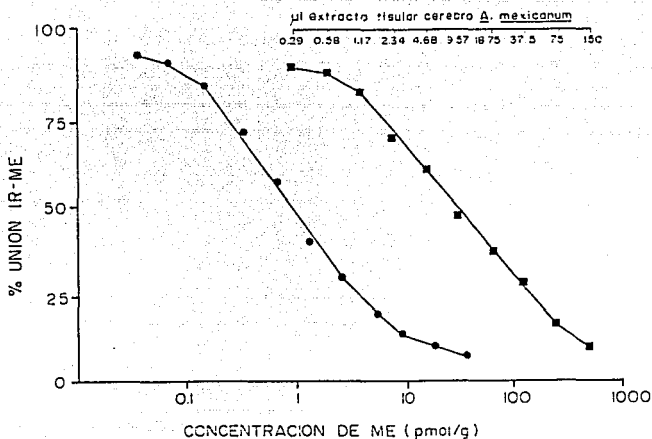
Quantificación de Encefalinas

La concentración de encefalinas se cuantificó mediante la técnica de RIA. En resumen la técnica consiste en: incubar por 24 horas a 4°C una alícuota de 100-150 microlitros de cada muestra problema previamente purificada con el antisuero (dilución inicial 1/2500 Anti-ME; 1/2000 Anti-LE) y el antígeno radioactivo correspondiente (5000 cpm cada tubo) en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M, pH 7.4 con 9% de Na Cl, 0.02% de azida sódica y 0.09% de gelatina. Cada punto de la curva patrón y cada una de las muestras problema se determino por triplicado.

Las fracciones unida y libre se separaron mediante la precipitación con una suspensión de carbón activado (1.25% carbón, 0.125% dextran, en amortiguador de fosfatos 0.05 M, pH 7.4) y centrifugación a 3 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la radioactividad en un contador gamma. Se calculó la concentración de ENKs en cada muestra mediante la utilización de una regresión lineal (logit) a partir de la curva estándar. Los resultados se expresan en picomoles por gramo (pmol/g) de peso.

Todas las curvas utilizadas para calcular las concentraciones tisulares presentaron un 50% de unión correspondiente a un rango de 1.2-1.9 pmol para LE y de 0.9 a 1.8 pmol para la ME. En todos los ensayos se incluyeron muestras testigo con valores alto, medio y bajo provenientes de tejido cerebral de A. mexicanum; los valores obtenidos respecto al calculo de su concentración estuvo siempre en el mismo rango. En la Fig. 8 se incluyen las especificaciones

A



B

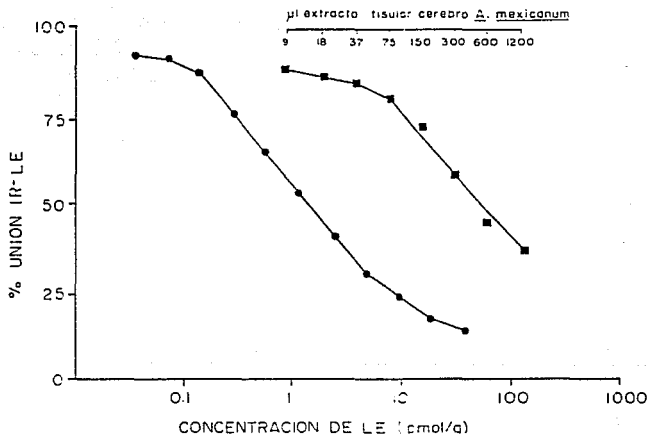


FIGURA 8. Inhibición de la unión de IR-ENKs al antisuero Anti-ENKs, ME y LE respectivamente. Cada punto es la media de los triplicados de incubación. A= corresponde al antisuero contra ME a una dilución inicial de 1:2500 (25% de unión máxima). La sensibilidad del ensayo es de 0.2 pmol/tubo. Los valores de concentración (pmol/tubo) testigo alto, medio y bajo fueron: 4.6 ± 0.4 , 1.2 ± 0.3 y 0.37 ± 0.01 respectivamente. B= antisuero contra LE a una dilución inicial de 1:2000 (25% de unión máxima). La sensibilidad es de 0.07 pmol. Los valores de concentración de los testigos alto medio y bajo fueron: 3.5 ± 0.3 , 1.2 ± 0.1 y 0.2 ± 0.01 pmol/tubo respectivamente. En el extremo derecho se incluyen los resultados de la dilución de tejido cerebral de A. mexicanum. Se observa un desplazamiento paralelo a la curva estándar correspondiente. Y en la parte superior derecha de cada encefalina se anotan los volúmenes del extracto cerebral.

respectivas y se muestran los desplazamientos de las diluciones tisulares de cerebro de A. mexicanum. se observa un desplazamiento paralelo entre las muestras problema y la curva estándar. Todas las muestras se analizaron por triplicado en dos ensayos diferentes con los mismos resultados.

Cuantificación de Triiodotironina (T3)

Como un criterio más sobre el progreso de la metamorfosis se cuantificó la concentración circulante de T3 en el suero de todos los animales. Esta determinación se llevo a cabo en el laboratorio de los Drs. Carlos Valverde-Rodríguez y Carmen Aceves del IIBM, UNAM; utilizando una técnica de RIA previamente descrita y estandarizada por este grupo (1, 128). La concentración de T3 se expresa en ng/dl.

Análisis de Resultados

Se efectuó un análisis de varianza para los valores de concentración de las ENKS y los valores de T3 circulante. Los valores de significancia de la comparación entre los valores control y respecto a la etapa inmediata anterior se calcularon en base a la prueba "t" de Student.

7. RESULTADOS

Cambios Fenotípicos y Conductuales.

Después de la administración de T4 en A. mexicanum fue clara la reabsorción de los pliegues dérmicos (aletas ventral y dorsal), la reabsorción de branquias y la oclusión de las hendiduras branquiales. También fue clara la disminución del peso corporal y la adquisición de una forma corporal más "ovalada" incluyendo la cabeza. La posición de los ojos se modificó; de tal forma que estos sobresalían a la cabeza y se formaron parpados (Fig. 9). La piel fue cornificándose y la pigmentación se reorganizó. Del mismo modo se observaron las mudas de piel características de la metamorfosis en los anfibios urodelos. En cuanto al comportamiento también se observaron cambios, en primer termino respecto al desplazamiento y a la alimentación. En las etapas intermedias de la metamorfosis, los animales redujeron notablemente el consumo de alimento. Ocurrió un cambio definitivo en la forma de locomoción; del desplazamiento por natación hacia desplazamiento mediante locomoción cuadrúpeda. En las etapas intermedias de la metamorfosis los animales reducen el consumo de alimento.

Parámetros morfométricos

En la Tabla 5 se presenta un resumen de los valores porcentuales de cada parámetro en el momento del sacrificio. En la Fig. 10 se presentan los resultados de los parámetros morfométricos a lo largo de la metamorfosis de A. mexicanum como resultado del tratamiento con T4. En el panel A se presentan los valores porcentuales de los siguientes

A



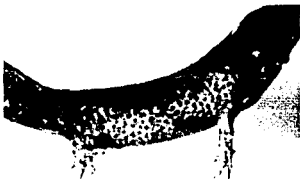
C 1



C 2



D 1



D 2



FIGURA 9. Fotografías de *A. mexicanum*, durante el desarrollo de la metamorfosis inducida con T4. En A se presentan los extremos del cuerpo, donde se distinguen bien las branquias y aletas prominentes. En B se observa el cuerpo completo y se distingue la disminución de la aleta dorsal. En C es clara la reabsorción tanto de las aletas como de las branquias, además en C1 y D1 se observa la tendencia para mantener el cuerpo fuera del agua conforme se desarrolla la metamorfosis. D2 corresponde a un organismo con metamorfosis completa, fuera del agua y visto de frente.

TABLA 5. Etapas de la metamorfosis T4-inducida en *A. mexicanum*. Cambios porcentuales de los diferentes parámetros morfométricos.

Etapa	LAD	AACD	AAV/AADx100	AAV/AADx100	AV AAD/ACx100	LBR5
	%					%
C1	100	100	40 ó más	-----	---	100
I	84±4	86±6	-----	25 a 10	---	85±4
II	61±1	71±4	-----	-----	0	50±6
III	51±1	69±1	-----	-----	25 a 10	25±2
IV	20±4	63±3	-----	-----	---	3±2

Los valores (%) corresponden a la media ± el error estándar (n=6). LAD=longitud aleta dorsal, AACD= ancho aleta caudo-dorsal, AAV=ancho aleta ventral, AAD=ancho aleta dorsal, AC=ancho cola, LBR5=longitud branquias.

parámetros: peso corporal (PC), ancho aleta caudodorsal (AACD), ancho aleta dorsal (AAD), ancho aleta ventral (AAV), longitud aleta dorsal (LAD) y longitud de branquias (LBRS); tanto para los organismos experimentales como para el grupo control de manipulación, teniendo como 100% los valores del día 0.

En los animales del grupo Cm, los parámetros morfométricos permanecen sin cambio a lo largo del estudio (parte superior de la gráfica). En contraste, los organismos experimentales mostraron una clara disminución en los valores de todos los parámetros. El peso corporal disminuyó hasta un 65 %, el AACD un 60%, la LAD hasta un 20% y la LBRS llegó de 3 a 0 % al final del proceso.

En el caso de las branquias es posible obtener un registro durante toda la metamorfosis. En la fig. 10 panel B se muestran estos valores. Es claro que la dosis de T4 utilizada la disminución en la longitud de branquias es gradual. En la primera fase global de la metamorfosis es un tanto lento y hacia la mitad del proceso los cambios se hacen más evidentes y a mayor velocidad. En la última fase vuelven a ser otra vez lentos.

Niveles Circulantes de T3

Los resultados se presentan en la **Tabla 6**. En los organismos control prácticamente no se detectó T3; mientras que en los animales experimentales la concentración de la hormona T3 aumentó progresivamente conforme avanzó la metamorfosis (etapa I, II y III). Los valores disminuyeron en la etapa IV respecto al III, pero aún fueron altos respecto al control.

Concentración de Encefalinas

A lo largo del estudio y solamente en los animales metamorfoseados la concentración de ambas ENKs cambió de manera diferencial y regionalizada. Las **tablas 7 y 8** resumen los resultados para una y otra ENK en las 5 estructuras analizadas. A continuación se hace una breve descripción de estos cambios, por estructura.

TELENCEFALO. La concentración de IR-ME disminuyó de una manera inmediata y significativa, a partir de la etapa I de la metamorfosis. Este decremento se sostuvo hasta la etapa III y fue seguido de un incremento (etapa IV), cuyos valores sin embargo, fueron menores a los detectados en el grupo control.

La reducción en la concentración de IR-LE fue más lenta y progresiva y alcanzó el valor menor en la etapa III de la metamorfosis. También se observó un incremento en la etapa IV, que no resultó significativo en relación al control, pero sí con respecto a la etapa inmediata anterior (**Fig. 11**).

DIENCEFALO. Al inicio de la metamorfosis (etapa I) la concentración de IR-ME disminuyó significativamente. Este descenso transitorio fue seguido por un incremento gradual que durante la etapa IV prácticamente duplicó los valores.

La concentración de IR-LE exhibió un perfil inverso. Durante la etapa I aumentó significativamente y subsecuentemente

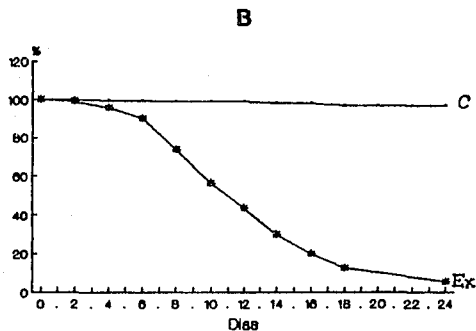
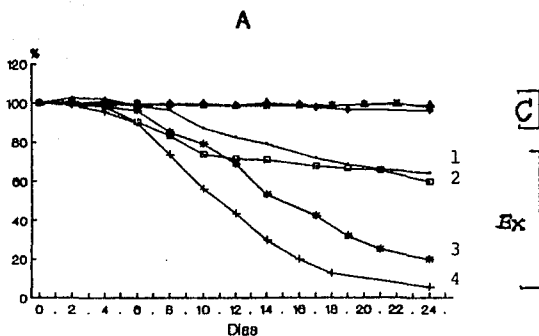


FIGURA 10. Porcentajes de reducción de los parámetros morfométricos durante la metamorfosis T4-inducida en Ambystoma mexicanum. Cada punto corresponde a la media de n=6. En A se incluye a la mayoría de los parámetros morfométricos y se comparan con los valores control. En B se separan los valores correspondientes al decremento en la longitud de branquias, ya que se trata de estructuras que se pueden seguir durante toda la metamorfosis. C=control, Ex=experimental. 1=peso corporal, 2=ancho de la aleta caudodorsal, 3=longitud de la aleta dorsal, 4=longitud de branquias.

TABLA 6. Niveles Circulantes de T3 durante las diferentes etapas de la Metamorfosis T4-inducida en A. mexicanum.

ETAPA	T3 (ng/dl)	DIA SACRIFICIO
C1 (Control de inyección)	n.d.	0
I	156 ± 5*	8
II	247 ± 13*	11
III	256 ± 6*	15
IV	196 ± 18*	24
Cm (Control de manipulación)	n.d.	25

Cada valor corresponde a la media + el error estándar (n=6). El día de sacrificio se refiere con respecto al día de aplicación del estímulo (T4) a los organismos experimentales. Los controles recibieron el volumen equivalente de solución Ringer y se sacrificaron en el momento señalado. El grupo control de manipulación fue medido igual que los experimentales. C1=control inicial, Cm=control de manipulación. n.d= no detectable. *= $P < 0.000$, en comparación a los valores control y en base a la prueba "t" de Student.

TABLA 7. CONCENTRACION DE IR-MET-ENCEFALINA EN CUATRO ESTRUCTURAS CEREBRALES E HIPOFISIS DE Ambystoma mexicanum DURANTE LA METAMORFOSIS INDUCIDA CON TIROXINA (T4).

ESTRUCTURAS	E	T	A	P	A	S
	CONTROL (0)	I (8)	II(11)	III(15)	IV(24)	
TELENCEFALO	2538 ± 44	1196 ± 42 ^{&}	1186 ± 13 ^{&}	1068 ± 33 ^{&}	1335 ± 38 ^{&1}	
DIENCEFALO	2426 ± 17	1182 ± 14 ^{&}	2283 ± 4 ^{a*}	3932 ± 47 ^{&*}	4842 ± 56 ^{&*}	
MESENCEFALO	2246 ± 9	1994 ± 48 ^{&}	2264 ± 41 ²	2432 ± 44 ^b	2404 ± 16 ^{&}	
ROMBENCEFALO	1095 ± 18	1730 ± 22 ^{&}	1063 ± 19 [*]	1074 ± 5	1629 ± 38 ^{&*}	
HIPOFISIS	1655 ± 21	1455 ± 21 ^{&}	1227 ± 6 ^{&*}	1166 ± 33 ^{&}	819 ± 6 ^{&*}	

Los grupos experimentales (I-IV) recibieron una sola inyección intraperitoneal de T4 (2.5 ug/g) en 100-200 ul de solución Ringer para anfibios. El grupo control recibió el volumen equivalente de solución y se sacrificó el día 0. Los criterios para la de finición de las etapas de metamorfosis se anotan en la tabla 5. El número dentro del parentesis indica el día de sacrificio, post-estímulo. Cada valor representa la media ± el error estándar de n=6 para cada estructura y grupo. Los valores de significancia se calcularon mediante la prueba "t" de Student. *, a, b = valores de P respecto al control. &, 1, 2 = valores de P respecto a la etapa inmediata anterior. & y * = P 0.000, a = P < 0.009, b y 2 = 0.002, 1 = P < 0.001. La concentración se expresa en pmol/g de tejido húmedo.

TABLA 8. CONCENTRACION DE IR-LEU-ENCEFALINA EN CUATRO ESTRUCTURAS CEREBRALES E HIPOFISIS DE Ambystoma mexicanum DURANTE LA METAMORFOSIS INDUCIDA CON TIROXINA (T4).

ESTRUCTURAS	E T A P A S				
	CONTROL (0)	I(8)	II(11)	III(15)	IV(24)
TELENCEFALO	104 ± 3	96 ± 5	81 ± 2 ^{&1}	66 ± 2 ^{&*a}	82 ± 3 ^{&*a}
DIENCEFALO	131 ± 4	159 ± 1 ^{&*a}	92 ± 3 ^{&*a}	77 ± 1 ^{&*a}	70 ± 2 ^{&*a}
MESENCEFALO	90 ± 4	81 ± 2	106 ± 4 ²	83 ± 2 ²	71 ± 2 ^{&3}
ROMBENCEFALO	91 ± 2	59 ± 2 ^{&}	52 ± 1 ^{&3}	54 ± 1 ^{&}	103 ± 3 ^{a*}
HIPOFISIS	402 ± 27	449 ± 11	536 ± 7 ^b	358 ± 2 [*]	183 ± 1 ^{&*a}

Los grupos experimentales (I-IV) recibieron una sola inyección intraperitoneal de T4 (2.5 ug/g) en 100-200 ul de solución Ringer para anfibios. El grupo control recibió el volumen equivalente de solución y se sacrificó el día 0. Los criterios para la definición de las etapas de metamorfosis se anotan en la tabla 5. El número dentro del parentesis indica el día de sacrificio, post-estimulo. Cada valor representa la media ± el error estándar de n=6 para cada estructura y grupo. Los valores de significancia se calcularon mediante la prueba "t" de Student. &, a y b = valores de P respecto al control. *, 1, 2, 3 = valores de P respecto a la etapa inmediata anterior. & y * = P 0.000, a = P 0.009, b y 2 = P<0.001, 1 = P 0.005, 3=P<0.006. La concentración se expresa en pmol/g de tejido humedo.

IR-ENKs en TELENCEFALO

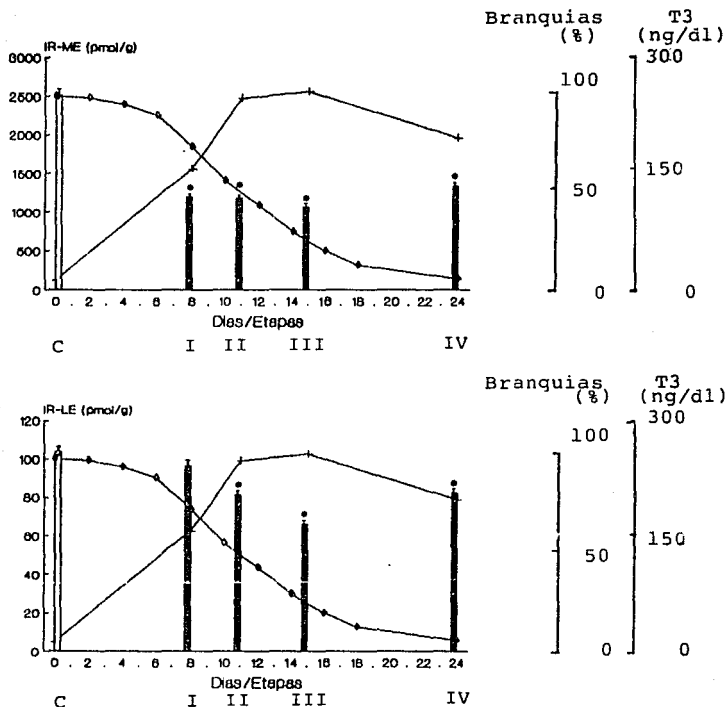


FIGURA 11. Concentración de IR-ENKs (pmol/g) en el TELENCEFALO de *Ambystoma mexicanum* en relación a los niveles circulantes de T3 (ng/dl) y a la reducción en la longitud de branquias (%) durante la metamorfosis T4-inducida. La concentración de IR-ENKs corresponde a las barras y sus valores se grafican de acuerdo a la escala de la izquierda. La primera barra de la izquierda corresponde a los valores de control y las otras 4 barras corresponden a las etapas de la metamorfosis (I-IV de izquierda a derecha). La línea con rombos corresponde a la longitud de branquias y la línea con cruces a los niveles circulantes de T3. Las escalas correspondientes a estos dos parámetros se anotan en el lado derecho. * = $P < 0.000$, comparados con el grupo control en base a la prueba "t" de Student.

IR-ENKs en DIENCEFALO

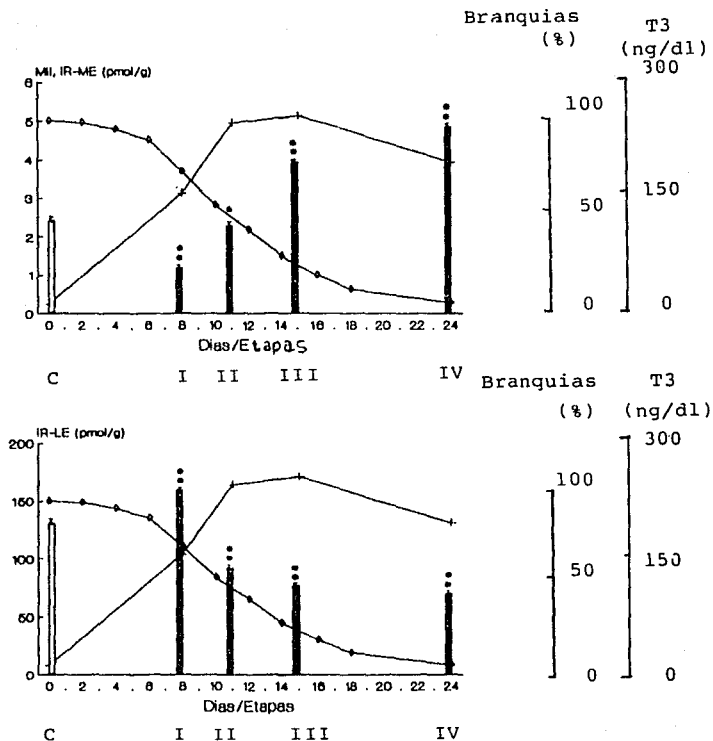


FIGURA 12. Concentración de IR-ENKs (pmol/g) en el DIENCEFALO de *Ambystoma mexicanum* en relación a los niveles circulantes de T3 (ng/dl) y a la reducción en la longitud de branquias (%) durante la metamorfosis T4-inducida. La primera barra de la izquierda corresponde a los valores control y las oscuras a las etapas de la metamorfosis (I-IV). ** $P < 0.009$, *** $P < 0.000$ en comparación con los valores control y en base a la prueba "t" de Student. El resto de la leyenda es igual que en la Fig. 11.

IR-ENKs en MESENCEFALO

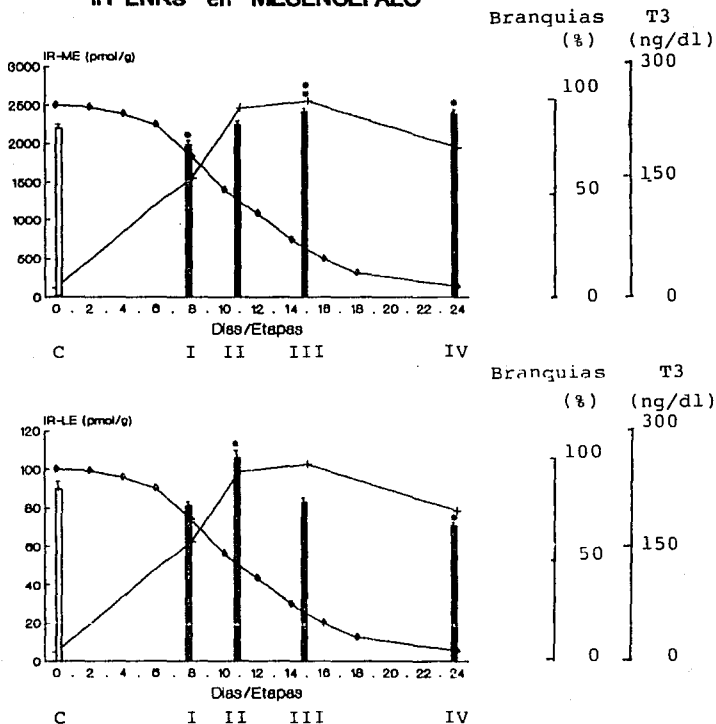


FIGURA 13. Concentración de IR-ENKs (pmol/g) en el MESENCEFALO de *Ambystoma mexicanum* en relación a los niveles circulantes de T3 (ng/dl) y a la reducción en la longitud de branquias (%) durante la metamorfosis T4-inducida. *= $P < 0.002$. **= $P < 0.000$ en comparación con los valores control y en base a la prueba "t" de Student. El resto de la leyenda es igual que en la Fig. 11.

IR-ENKs en ROMBENCEFALO

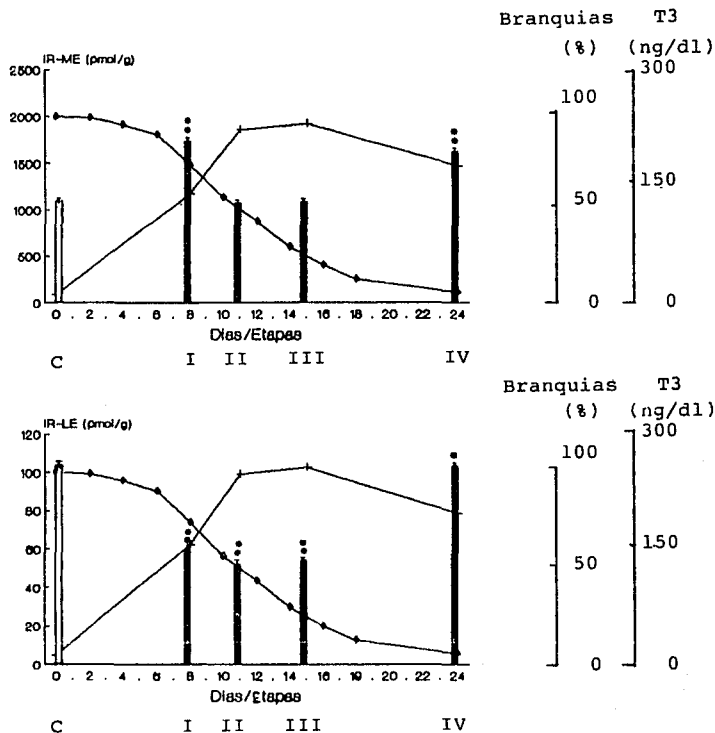


FIGURA 14. Concentración IR-ENKs (pmol/g) en el ROMBENCEFALO de *Ambystoma mexicanum* en relación a los niveles circulantes de T3 (ng/dl) y la reducción en la longitud de branquias (%) durante la metamorfosis T4-inducida. *= $P < 0.009$, **= $P < 0.000$ en comparación con el control y en base a la prueba "t" de Student. El resto de la leyenda es igual que en la Fig. 11.

IR-ENKs en HIPOFISIS

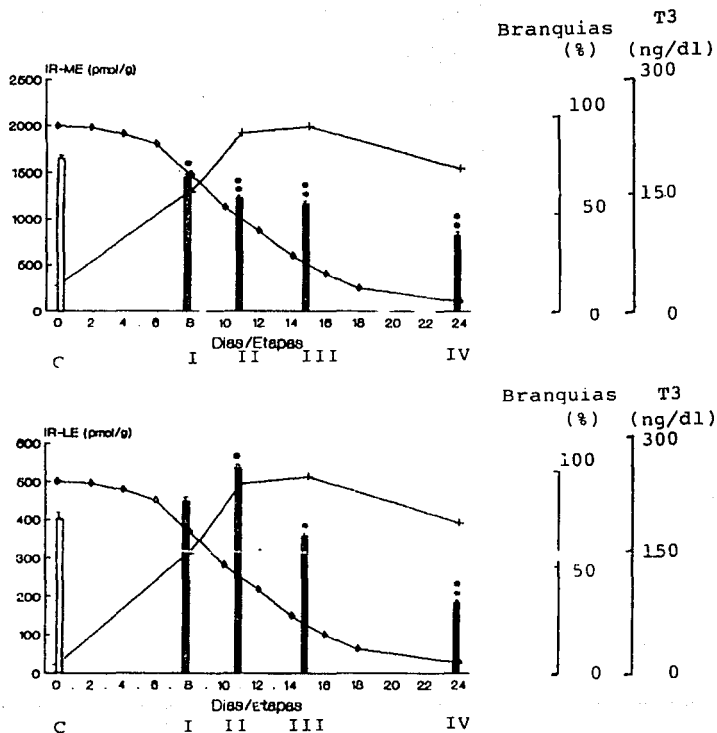


FIGURA 15. Concentración de IR-ENKs (pmol/g) en la HIPOFISIS de *Ambystoma mexicanum* en relación a los niveles circulantes de T3 (ng/dl) y la reducción en la longitud de branquias (%) durante la metamorfosis T4-inducida. *= $P < 0.001$. **= $P < 0.000$ en comparación con el control y en base a la prueba "t" de Student. El resto de la leyenda es igual que en la Fig. 11.

disminuyó de manera progresiva, hasta alcanzar valores considerablemente menores (etapa IV) (Fig. 12).

MESENFALO. En esta estructura la concentración de IR-ME presentó un decremento significativo en la etapa I. En la etapa II se recuperaron los valores control y en las etapas III y IV fueron significativamente mayores.

La concentración de IR-LE disminuyó significativa en la etapa I. En la etapa II ocurrió un incremento y finalmente en las etapas III y IV los valores volvieron a disminuir, incluso por abajo del control (Fig. 13).

ROMBENCEFALO. La concentración de IR-ME en la etapa I incrementó significativamente con respecto a los valores control. En las dos siguientes etapas la concentración de IR-ME regresó a los valores control y en la etapa IV se observó un nuevo incremento.

La concentración de IR-LE disminuyó significativamente durante las 3 primeras etapas, y posteriormente exhibió un aumento notable (etapa IV), que incluso rebasó los valores control (Fig. 14).

HIPOFISIS. En esta estructura se presentó una disminución gradual de la concentración de IR-ME, con diferencias significativas respecto al control en cada caso. En las etapas II y IV también se observaron diferencias significativas respecto a la etapa inmediata anterior.

La concentración de IR-LE presentó un incremento gradual hasta la etapa II, a partir de la cual ocurrió un decremento con diferencias significativas respecto a los controles y a la etapa inmediata anterior en III y IV. (Fig. 15).

8. DISCUSION

Los resultados particulares respecto a la formación de la colonia (Anexo I) y a la estandarización del método de inducción de metamorfosis (anexo II) se discuten en la sección correspondiente. Sin embargo, aquí es pertinente destacar que la información y material biológico resultante de la reproducción de Ambystoma mexicanum en cautiverio fue primordial para el desarrollo de la presente tesis. De hecho, por sí sola la reproducción de la especie en cautiverio aportó información de gran relevancia en cuanto a la biología del desarrollo de la especie. Por otro lado a partir de la estandarización de la inducción de metamorfosis lograda en la primera fase de esta tesis fue posible encontrar la vía, frecuencia y dosis de T4 adecuadas para reconocer las etapas de la metamorfosis de manera clara y precisa.

Hasta donde sabemos este es el primer estudio que informa el hallazgo de que la metamorfosis T4-inducida en A. mexicanum se asocia a cambios regionales en la concentración cerebral de hipofisiaria de las ENKs. El rompimiento de la neotenia por T4 y la inducción concomitante de metamorfosis confirma numerosos estudios, en relación a la dependencia del proceso de metamorfosis con respecto a la función tiroidea

(59, 88). Como ya se revisó (veáse sección metamorfosis, pag. 14), se trata de un proceso adaptativo de reorganización y desarrollo morfo-funcional complejo, que dependiendo del "destino" final de las estructuras, órganos y/o funciones involucrados, abarca al menos tres categorías: reducción o eliminación, reorganización y maduración (12, 46, 72). En este contexto el SNC y la hipófisis corresponden a estructuras/función de la segunda y tercera categorías. Se trata de estructuras ya presentes como la unidad hipotálamo-hipófisis (H-H) que participan activamente en la metamorfosis y en las cuales ocurre una reestructuración morfo-funcional que permite la adaptación del organismo a un nuevo habitat (17, 46). Más aún, en términos adaptativos, esta reorganización morfofuncional de la unidad H-H resulta primordial para regular y mantener variables fisiológicas cuyos puntos de ajuste difieren (cuali- y cuantitativamente) de los que el organismo requería en el habitat anterior; Vgr., temperatura corporal, equilibrio hidrosmótico, etc. Los cambios asociados a esta unidad regulan todas las funciones neuroendocrinas que requieren de un reajuste con la metamorfosis. Del mismo modo que las funciones sensoriales y motoras reguladas por las otras regiones cerebrales extrahipotalámicas (telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo) (39, 46).

Metamorfosis: Criterios Morfométricos

La razón para establecer criterios metamórficos para A. mexicanum es obvia, puesto que se trata de una especie neoténica, en la que puede inducirse la metamorfosis; mientras que A. tigrinum presenta metamorfosis espontánea. El estudio de Norman se llevó a cabo con A. tigrinum provenientes del campo y se establecieron 7 etapas de metamorfosis. En tanto que en el presente estudio se trabajó con una población homogénea de A. mexicanum resultante de la reproducción en nuestra colonia y se definieron 4 etapas.

Las equivalencias y/o coincidencias se indican en la tabla 3 (pag. 6). Los criterios principales de metamorfosis en ambos estudios fueron considerados en base a la reducción en el ancho de la cola, el ancho de las aletas dorsal y ventral. El trabajo de Norman no es explícito en cuanto al punto de referencia considerado para efectuar las mediciones de estos parámetros. Por lo tanto, aquí se hicieron las mediciones en referencia a una estructura anatómica constante. Las mediciones del ancho de la cola y de las aletas se efectuaron 1 cm posterior a la cloaca. También consideramos otros parámetros morfométricos, en particular el porcentaje de reducción en la longitud de las branquias, ya que en A. mexicanum su disminución es progresiva a lo largo de todo el proceso. En ambos estudios el criterio de finalización de la metamorfosis es precisamente la reabsorción total de las branquias.

Es importante hacer notar que aún es necesario unificar los criterios para definir las etapas metamórficas en anfibios urodelos ya que los puntos de referencia de los cambios en este grupo no son tan evidentes como en anfibios anuros.

Metamorfosis y Tironinas

Los resultados de esta tesis comprueban el efecto de la T4 sobre el rompimiento de la neotenia en A. mexicanum. Del mismo modo se confirman numerosos estudios, algunos ahora clásicos (4, 5, 69) sobre la dependencia del proceso de metamorfosis con respecto a las hormonas tiroideas (HT) (39, 59, 88).

Se sabe que el inicio de la metamorfosis en anfibios depende de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (H-H-T), mediante un mecanismo de retroalimentación positiva ejercido por la T4 (17, 46, 88). Los resultados de esta tesis y los de otros autores (44, 88, 151) muestran que en anfibios neoténicos como A. mexicanum los niveles basales de T4 son muy bajos. Este hecho ha llevado a proponer que en estos organismos no ocurre la retroalimentación positiva que desencadenaría la cascada de cambios tanto en los tres substratos anatómicos como en los tejidos periféricos (17, 88, 123). Los resultados de la presente tesis son consistentes con el planteamiento de que la ausencia de metamorfosis en A. mexicanum es secundaria a un "hipotiroidismo relativo" y no a la falta de responsabilidad de la unidad H-H y de los tejidos periféricos a las tironinas (40, 123). Sin embargo, es necesario recordar que en todos los vertebrados la T4 es una prohormona sintetizada y secretada exclusivamente por la glándula tiroides, y que dependiendo del anillo en el que ocurre su desyodación periférica da lugar, a la formación de la triiodotironina activa (T3) o inactiva (rT3) (17, 46, 175).

En este contexto, los resultados de esta tesis indican que la T4 administrada en A. mexicanum, además de desencadenar la metamorfosis, fue desyodada hacia T3 (144). En efecto, en los organismos sin estimulación con T4 (grupos C1 y C2) los niveles plasmáticos de T3 fueron indetectables. Otros investigadores, utilizando un método de extracción y concentrando las muestras de plasma 4 veces, informan valores muy bajos de T3 (12.5+ 0.8 pg/dl) (82).

Por el contrario, en los organismos T4-estimulados la concentración de T3 aumento de manera significativa y progresiva hasta el final de la metamorfosis (etapa IV) cuando ocurrió un decremento en relación a la etapa anterior. Este perfil temporal en los niveles circulantes de T3 durante la metamorfosis en A. mexicanum es consistente con los resultados obtenidos por otros investigadores (82, 88, 151).

La desyodación del anillo externo de la T4 se denomina de activación o vía 5'D y la del interno se llama de inactivación o vía 5D. Las isoenzimas, 5'DI y 5'DII catalizan la vía 5'D y la isoenzima tipo III cataliza la vía 5D (175).

En anfibios anuros la conversión periférica de T4 hacia T3 es catalizada por la 5'DI y es un paso fundamental en la inducción de la metamorfosis (28).

En anfibios urodelos existen evidencias que sugieren la desyodación periférica (82, 88, 151). Aunque también se ha propuesto que la T3 deriva directamente de la tiroides (88). Por otro lado, en urodelos neoténicos, solo conocemos un estudio en el que no ha detectado actividad desyodativa en tejidos periféricos (88). Sin embargo, estos resultados

negativos son inconsistentes con los siguientes datos. El contenido intraglandular (tiroides) de T4 en urodelos neoténicos es mayor que el de T3, mientras que la proporción T3/T4 en plasma es más alta, tanto en organismos neoténicos como metamorfoseados (151). Además, al comparar las proporciones T3/T4 plasmáticas entre organismos neoténicos y metamorfoseados, los valores son mayores en organismos con metamorfosis. Todo lo anterior y los resultados de la presente tesis apoyan la posibilidad de que en urodelos neoténicos existe actividad periférica 5'DI y que es la más pronunciada después de la metamorfosis (82).

Metamorfosis y Encefalinas en la unidad Hipotálamo-Hipofisis

Los resultados en esta tesis indican que la administración de T4 induce la metamorfosis en A. mexicanum y que simultáneamente aumentan los niveles circulantes de T3 y se modifican las concentraciones cerebrales e hipofisarias de las ENKs.

Los cambios de IR-ME en diencéfalo e hipófisis fueron opuestos a lo largo de la metamorfosis. Al final del proceso (etapa IV) la concentración hipofisaria de IR-ME descendió en un 50%, mientras que en el diencéfalo, los valores se duplicaron. Al mismo tiempo, los cambios de IR-LE fueron paralelos y presentaron un patrón bifásico, disminuyendo (50%) al final del proceso (véase Fig. 16 A y B).

Por el momento, estos hallazgos son difíciles de interpretar; aunque resulta atractivo plantear una relación causal entre ellos y el proceso de la metamorfosis, también es probable que solamente se trate de epifenómenos asociados a dicho evento. La dificultad estriba en el hecho de que la información acerca del papel fisiológico de las ENKs en los vertebrados es aun escasa y fragmentada.

La participación de la unidad H-H en la regulación de la metamorfosis en anfibios se ha demostrado de manera amplia (17, 44, 46, 88, 123). Se sabe que este proceso de maduración y desarrollo depende de la función de la unidad H-H, y su interacción con la glándula tiroides (40, 59, 88).

En la mayoría de los vertebrados la glándula tiroides se activa mediante el estímulo de la TSH secretada por la adenohipófisis que a su vez responde al tripeptido hipotalámico (TRH) (17). Aunque en algunos anuros se ha demostrado que el factor hipotalámico activador corresponde a la TRH (42, 85); en urodelos neoténicos (41, 147) e incluso algunos anuros (142), esta vía podría ser distinta. Al parecer en anfibios neoténicos como A. mexicanum, la TRH no es el mensajero central que estimula la secreción de la TSH, al menos no directamente (41, 170). El hipotálamo de A. mexicanum (Dra. P. Joseph, 1988, datos no publicados) como en otros vertebrados, contiene cantidades significativas del tripeptido (79). Por otro lado, en anfibios con metamorfosis espontánea la concentración de TRH aumenta (85). En contraste, en A. mexicanum el contenido hipotalámico de TRH no cambia durante la metamorfosis T3-inducida (147) y además, la administración de TRH no tiene efectos metamórficos (41, 170). Estas evidencias,

IR-ME

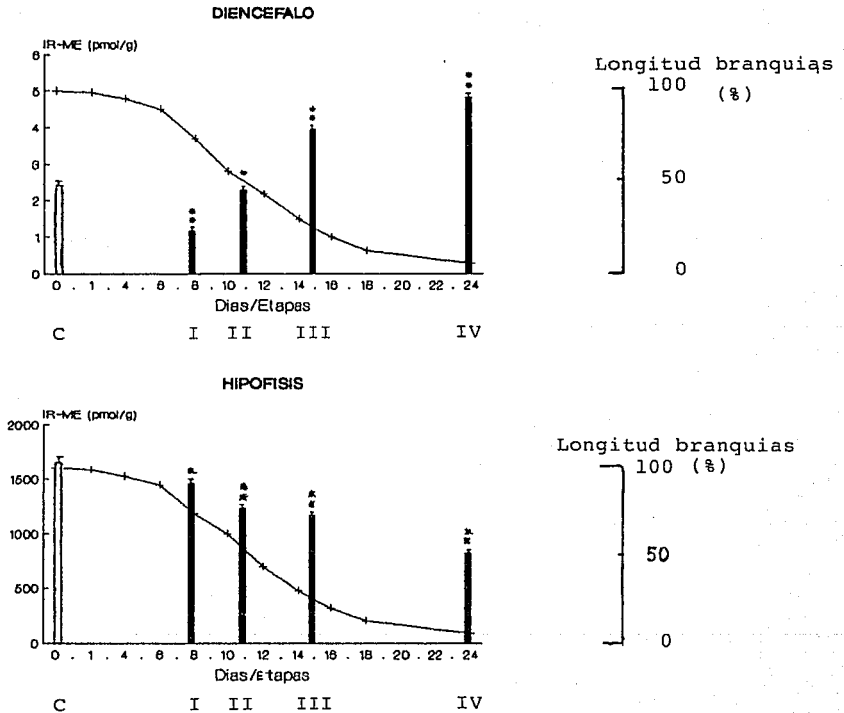


FIGURA 16 A. Cambios en la concentración de IR-ME en el diencefalo y la hipófisis de *A. mexicanum* durante la metamorfosis T4-inducida. Se incluyen los valores de la reducción de branquias como criterio metamórfico. En el extremo derecho se anota la escala correspondiente.

IR-LE

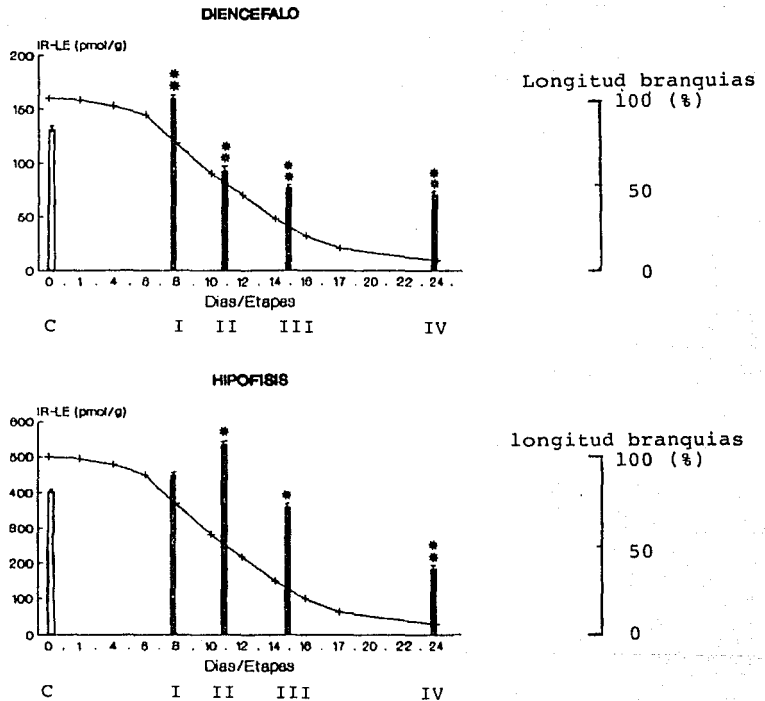


FIGURA 16 B. Cambios en la concentración de IR-ME en el diencéfalo y la hipófisis de *A. mexicanum* durante la metamorfosis T4-inducida. Se incluyen los valores de la reducción de branquias como criterio metamórfico. En el extremo derecho se anota la escala correspondiente.

plantean la interrogante de cuál o cuáles podrían ser los factores hipotalámicos que regulan la metamorfosis en anfibios neoténicos; o bien, qué factores intervienen en la acción de la TRH misma. En este sentido conviene recordar que el modelo propuesto por Etkin (Fig. 3) sugiere la participación de un factor hipotalámico inhibidor de la secreción de la PRL, que en respuesta al incremento inicial de la HT disminuiría la secreción de esa hormona hipofisaria y desencadenaría la metamorfosis.

Esta situación aunada a los hallazgos de la presente tesis permiten plantear que en anfibios las ENKs de la unidad H-H podrían participar activamente en el proceso de la metamorfosis. En mamíferos se ha considerado la posibilidad de que los péptidos opioides tengan acciones directas sobre la liberación hipotalámica de las hormonas hipofisiotrópicas (110, 111). Así, la administración de ENKs incrementa los niveles circulantes de PRL, GH, TSH (26, 99, 165, 153), disminuye los niveles de LH, FSH y cortisol (26, 165, 174) y ejerce un efecto dual en la secreción de VSP y OXT (108, 167, 174). La naloxona tiende a reducir los niveles circulantes de PRL y disminuye la TSH en humanos (2). En otro estudio se demostró que la naloxona en humanos incrementa los niveles de cortisol, LH y FSH (114). Estos últimos hallazgos indican que la interacción de las ENKs con la PRL, TSH, LH y FSH podría ser a través de los receptores opiáceos como se ha propuesto en otros estudios (47). Incluso también hay evidencias que indican la interrelación de los sistemas de los receptores a opiáceos y la TRH (14, 119).

Por otro lado, también se ha considerado la acción de la PRL durante el desarrollo de los anfibios en asociación con otros mensajeros químicos (134, 181). Las ENKs aumentan los niveles de PRL y TSH (2, 26, 34, 165) y modifican los niveles de VSP y OXT (108, 167). A su vez las OXT y VSP promueven la metamorfosis en anfibios (181). Evidencias que permiten plantear la posibilidad de que las ENKs podrían participar en el proceso de la metamorfosis mediante un mecanismo de interacción múltiple, forma de interacción que también se ha sugerido en mamíferos (115, 186).

Durante la metamorfosis de los anfibios, uno de los aspectos que se modifican es la coloración. En A. mexicanum se observó una redistribución de pigmentos, de tal forma que el tono obscuro se hizo más uniforme. La pigmentación en anfibios se regula mediante la acción de la MSH. Las posibilidades de interacción entre las ENKs, la MSH y la β -endorfina se ha evidenciado en mamíferos; en particular se sabe que la LE modula la secreción de la MSH (7), lo que plantea que una interacción entre las ENKs y el sistema de la MSH durante la metamorfosis de A. mexicanum es probable.

Desde otro punto de vista, los resultados de esta tesis son consistentes con los presentados por otros investigadores, con respecto a que los sistemas de mensajeros químicos en el sistema nervioso se modifican a lo largo de la metamorfosis en anfibios (32, 33). Los sistemas de vías neurales correspondientes al factor liberador de la corticotropina (FLC) y a la AVT se desarrollan con la metamorfosis en Rana

catesbiana (32). Mientras que los niveles circulantes de corticosterona cambian en forma bifásica durante la metamorfosis de A. tigrinum, con los niveles más altos a la mitad del proceso (33). Ambos estudios establecen una relación entre los cambios de estos mensajeros químicos y la función del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas interrelales de anfibios, en particular en relación a la esteroidogénesis; función que en anfibios se desarrolla con la metamorfosis (32). La relación de las ENKs con la esteroidogénesis en anfibios también se ha sugerido, solo que en relación a su presencia en las células cromafines (95), más que en el cerebro e hipófisis.

Estos hallazgos y los cambios en la concentración de las ENKs en la unidad H-H que aquí se presentan, resaltan la importancia de las modificaciones en tales sistemas como parte del reacomodo de los mecanismos de ajuste a una nueva forma de vida, que implica la metamorfosis.

La metamorfosis en anfibios constituye un proceso adaptativo de reorganización y desarrollo complejo. Las estructuras que se analizan en el presente estudio corresponden a estructuras ya presentes, que ajustan sus características a los nuevos requerimientos (12, 17, 46, 72).

La reorganización conductual, funcional y morfológica resulta primordial en la regulación y el mantenimiento de variables fisiológicas, cuyos puntos de ajuste difieren cuali- y cuantitativamente de los que el organismo requería en el habitat anterior. Se considera que los cambios asociados a la unidad H-H regulan todas las funciones neuroendocrinas (46, 104), por lo que los cambios en los sistemas encefalinérgicos podrían relacionarse con el proceso general de reorganización que ocurren en la unidad H-H durante la metamorfosis. Por ejemplo, en relación al equilibrio hidrosmótico y el control de la temperatura corporal; aspectos de vital importancia, sobre todo si se considera que con la metamorfosis, los organismos tienen que adaptarse a un nuevo habitat. Evitar la pérdida de humedad en estos vertebrados se logra por un ajuste entre la temperatura corporal y el termostato hipotalámico en relación a las temperaturas ambientales por medio de modificaciones conductuales ya que se trata de organismos poiquiloterms. El hipotálamo activa los mecanismos encaminados a minimizar la pérdida de calor (104).

Se considera que en anfibios la reabsorción de las aletas caudales durante la metamorfosis puede funcionar como un mecanismo osmoregulador en la naturaleza y que tanto la PRL como la OXT participan en este proceso (134). Se ha evidenciado que la OXT y la VSP promueven la metamorfosis (181) y al parecer la OXT actúa contrarrestando la acción antiurética de la PRL a nivel tisular (134). Del mismo modo en mamíferos se ha sugerido la participación de las ENKs en la osmoregulación (108, 167).

Cambios Cerebrales Extrahipotalámicos

La metamorfosis implica cambios sustanciales en la fisiología global del organismo, por lo que es razonable que la concentración de ENKs también cambiara en las regiones

cerebrales extrahipotalámicas (telencéfalo, mesencéfalo y rombencefalo). El significado de estos cambios podría relacionarse con las funciones que cada región cumple durante y después de la metamorfosis.

Telencéfalo

Los cambios en la concentración de las ENKs en esta estructura durante la metamorfosis podrían relacionarse con los ajustes del sistema para adquirir nuevos hábitos de vida y otros patrones de comportamiento que permitiera a los organismos sobrevivir en el medio terrestre. La concentración de IR-ME en telencéfalo disminuyó con la metamorfosis y en la última etapa se presentó un aumento respecto a la etapa III, sin embargo los valores son significativamente menores con respecto a los grupos control (Fig. 11). La concentración de IR-LE disminuyó hasta la segunda etapa y después se presentó un incremento que no rebasó los valores control en la etapa IV. Por lo tanto al final de la metamorfosis, la concentración de ambas ENKs es menor que en los organismos sin metamorfosis.

El telencéfalo regula principalmente las funciones olfativas (46, 143, 180). El olfato ha tenido una gran importancia en la función adaptativa de los animales, al suministrarles información proveniente de distancias mayores en corrientes de agua o en el viento. Los anfibios a menudo localizan su alimento e incluso sus estanques, a kilómetros de distancia, mediante el sentido del olfato, de ahí la importancia del telencéfalo como un centro cuyas principales funciones son olfativas. La difusión de las sustancias en un medio líquido es distinta que a través de aire, así el sistema de captación de este tipo de estímulos se ve obligado a cambiar (104). La integración de respuestas sensoriales y motoras, así como la coordinación de las respuestas condicionadas y el comportamiento instintivo simple también se regulan a nivel del telencéfalo en los anfibios (143, 182, 104).

El reacomodo de los sistemas de mensajeros químicos que acompañan a la metamorfosis como los cambios en la concentración de ENKs que observamos en telencéfalo podría ocurrir también con otros neuropéptidos; como por ejemplo en el caso de la sustancia P, la somatostatina y el VIP, que se han detectado en el telencéfalo de *A. mexicanum* (38).

La presencia de ENKs en el telencéfalo de otros vertebrados no mamíferos también se ha demostrado. En reptiles y aves las ENKs se localizan el área ventrolateral (22, 118, 139). Se observa un paralelismo entre la distribución de las ENKs, la sustancia P, catecolaminas y acetilcolinesterasa (22). Se sugiere que muchas de estas vías se formaron en etapas iniciales de la evolución de los amniotas y han permanecido en las especies vivientes en estas clases de vertebrados. Además aquí se presentan evidencias sobre la presencia de las ENKs en el telencéfalo de un anfibio, que como grupo, apareció previamente a los amniotas, de hecho los anfibios son anamniotas. Tales relaciones hacen notar la universalidad de los sistemas encefalínérgicos dentro del reino animal.

Mesencéfalo

Los cambios en la concentración de IR-ME en mesencéfalo presenta un desarrollo semejante al observado en diencéfalo, aunque de manera menos pronunciada, con un decremento en la primera etapa y aumentos progresivos en las etapas subsiguientes. Respecto a la IR-LE se observa un decremento en la primera etapa y un aumento máximo en la segunda etapa, a partir de donde se observa un nuevo decremento, rebasando los valores de control, con un resultado final significativamente mayor al control.

Esta estructura cerebral regula el sentido de la vista (46, 143, 180). Las proyecciones visuales cambian con la metamorfosis en anfibios. Durante la metamorfosis los ojos de los organismos sobresalen a la cabeza y se ha propuesto que el aumento en el campo visual que ocurre con la metamorfosis en el tectum, es el resultado de un reacomodo de la función en el medio terrestre (164). Se ha sugerido también la participación de las ENKs en las proyecciones visuales de A. tigrinum (178), en aves (166), reptiles (49) e incluso en crustáceos (82, 104). Nuestros resultados respecto a los cambios en la concentración de las ENKs en el mesencéfalo podrían relacionarse con las funciones de las proyecciones visuales hacia el tectum durante la metamorfosis y con la función general del mesencéfalo sobre la integración sensorial.

Rombencéfalo

En esta estructura la IR-ME aumenta en la primera etapa; en las etapas II y III regresa a los valores de control y finalmente aumenta otra vez. La IR-LE disminuye en las 3 primeras etapas y regresa a los valores de control en la última etapa. En los extremos del proceso los resultados obtenidos en esta estructura son concordantes con los encontrados en A. tigrinum; con mayor concentración de IR-ME y sin diferencias en la concentración de IR-LE en organismos metamorfoseados respecto a los no metamorfoseados (30). El rombencéfalo pertenece al tallo cerebral, que en reptiles también presenta IR para las ENKs (184).

Los cambios en la concentración de IR-ENKs en el rombencéfalo podría relacionarse con las funciones de regulación motora y de equilibrio que esta estructura cumple. En anfibios a través del rombencéfalo pasan todos los nervios sensoriales (excepto los de la visión y el olfato) y las fibras que controlan casi todas las motoneuronas. Las funciones del rombencéfalo son claramente modificadas durante la metamorfosis, sobre todo en las etapas intermedias donde los organismos regulan el gasto de energía mediante la reducción de desplazamiento. Las modificaciones en la forma de locomoción asociadas a la metamorfosis tiene que ver con una regulación rombencefálica (104). Del mismo modo, existen estudios que evidencian la participación de los sistemas opioides en la regulación de las funciones motoras en anfibios urodelos (43, 131) y en procesos nociceptivos (163). Por otro lado se sabe de la intervención de la T4 sobre la formación

inicial de la columna motora lateral y diferenciación de las motoneuronas en anuros (142).

Consideraciones Generales sobre la Metamorfosis y las Encefalinas

A. mexicanum puede forzarse a presentar metamorfosis por la administración de T4 y como resultado de esto puede desarrollar características maduras y rasgos somáticos terrestres incluyendo vías y sistemas particulares en el cerebro. Además de la modificación en el sistema de vías nerviosas como ha sido demostrado por los estudios de Stirling respecto al aumento del campo visual en el tectum (164), también ocurren cambios en los sistemas de neurosecreción como es el caso de la AVT, de el FLC (32) y de las ENKS, como en el presente estudio se demuestra.

Ante la presencia de diferentes mensajeros químicos en el SNC de A. mexicanum, podría ser que cada uno actuara de manera diferencial en la metamorfosis. Es decir que mientras la VSP y OXT participan en la regulación de la reabsorción de las aletas como un mecanismo osmoregulador, las ENKS podrían actuar a nivel de la unidad H-H regulando los mecanismos hidrosmóticos y de control de temperatura, al mismo tiempo que en las regiones extrahipotalámicas podrían intervenir en la integración nerviosa que conlleva la adquisición de nuevos hábitos de vida, en particular respecto a la percepción de estímulos y desplazamiento que le permitirán sobrevivir en un medio más cambiante que el acuático, donde será necesario evitar la pérdida de humedad, protegerse de sus depredadores, conseguir su alimento y encontrar las condiciones adecuadas para su reproducción.

Los cambios en la concentración de ENKS podrían asociarse a funciones específicas, como ocurre con los cambios en las vías neurales del FLC y la AVT así como con los cambios en los niveles circulantes de la corticosterona durante la metamorfosis en asociación con la esteroidogénesis (32, 33).

En el planteamiento del presente estudio se consideró la posibilidad de relacionar a las ENKS como una causa o un efecto de la metamorfosis. De acuerdo a los resultados obtenidos, es claro que no se puede afirmar ninguna conclusión definitiva en este sentido, sin embargo, por la forma como se presentan los cambios, principalmente en diencefalo e hipófisis (estructuras anatómicas que se sabe participan en la regulación de la metamorfosis), se considera que las ENKS en estas dos regiones sí podrían participar en la modulación del sistema de manera causal. Aunque con los resultados hasta la fecha obtenidos no es posible descartar la posibilidad de los cambios que se observan en la concentración de las ENKS en estas dos regiones sean un efecto de la metamorfosis.

Los cambios en la concentración cerebral de ENKS en las etapas intermedias de la metamorfosis podrían tener relación con la necesidad de cambios de hábitos y comportamiento ante los posibles depredadores durante la metamorfosis, momento en el cual los organismos son sumamente susceptibles; así como en la elección del lugar para evitar la pérdida de humedad. Si los cambios observados al final de la metamorfosis son

permanentes en la vida adulta en pleno, entonces su significado tendría que ver más directamente con las funciones asociadas a las condiciones de vida terrestre, aspecto que podría averiguarse al efectuar cuantificaciones de ENKs a diferentes tiempos postmetamorfosis.

Es de esperarse que con la metamorfosis cambie más de un sistema de mensajeros químicos, como se ha demostrado con el FLC y AVT en Rana esculenta (32). Por otro lado, será necesario analizar de manera detallada la función de cada estructura en relación a los cambios en los sistemas encefalinérgicos en base a diferentes estrategias experimentales que involucren un análisis farmacológico, anatómico y funcional. Los resultados aquí obtenidos podrían implicar una relación funcional en asociación directa con su unión a los receptores opioides. Por otro lado los cambios en la concentración pueden reflejar cambios a nivel de la síntesis o de la liberación de estos péptidos opioides, aspectos que será necesario analizar en el futuro.

APENDICE

Anexo I. Formación de la Colonia de Ambystoma mexicanum en Condiciones de Laboratorio.

Captura y Acondicionamiento en el Laboratorio

La formación de la colonia en nuestro laboratorio se logró a partir de especímenes recolectados en el campo (remanentes de los canales de Xochimilco). Para lo cual se realizaron recorridos a lo largo de los canales, principalmente en la zona correspondiente al Puente de Urrutia y San Gregorio Apatlaco, Xochimilco; efectuandose muestreos constantes.

En el recorrido por los canales de Xochimilco pudimos observar que A. mexicanum se localiza principalmente en la zona cercana al puente de Urrutia. En las otras zonas la presencia de la especie es menos evidente. Los organismos se encuentran preferentemente en las zonas donde existe una cantidad considerable de lodo y fitoplanctón. Los especímenes están precisamente entre el lodo, aunque eventualmente salen a la superficie.

Se realizaron varias visitas para el reconocimiento de la zona durante los meses de Agosto a Octubre de 1988, hasta identificar un lugar accesible para la captura de A. mexicanum. Para realizar la captura se solicitó un permiso a la SEDUE, que fue otorgado en Marzo de 1989. En septiembre de 1988 se capturaron 7 organismos (4 hembras y 3 machos). En el siguiente año a partir de la autorización de la SEDUE se efectuaron registros constantes en los canales y durante los meses de Septiembre y Octubre fue posible capturar un total de 22 ejemplares (15 hembras y 7 machos).

La captura se logró mediante la utilización de un chinchorro y redes individuales. Se capturaron los organismos tanto machos como hembras sexualmente maduros, se colocaron en un recipiente con agua del mismo canal y se trasladaron al laboratorio.

Los animales recolectados se colocaron en peceras con agua del canal, con un nivel de 10 cm. (4 organismos por pecera, 50x40x30 cm). Se suministró oxigenación constante mediante una bomba de aire. Al siguiente día de haber ingresado al laboratorio se eliminó la mitad de agua del canal, intercambiandola por agua de la llave reposada y aireada previamente. La eliminación total del agua del canal, se hizo de manera gradual, sustituyendo cada tercer día un medio del volumen existente por agua de la llave dechlorinada.

Las peceras se mantuvieron en un cuarto independiente con un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas, comenzando el periodo de luz a las 7 A.M.

La respuesta al acondicionamiento de los organismos capturados fue positiva, puesto que la población recolectada se mantuvo estable por un periodo mayor a un año.

Alimentación

La alimentación consistió en peces pequeños vivos capturados en el mismo canal. Conforme se fueron terminando los peces, la alimentación se sustituyó por carne fresca de res en pequeños fragmentos; depositada a en una cantidad de 25 a 30 g por pecera con 4 animales, cada tercer día.

Después de esta primera fase se probaron diferentes formas y tipos de alimento y los resultados obtenidos mostraron la flexibilidad para manejar este parámetro en cautiverio. Probamos tres tipos de alimento y dos formas de suministro para adultos. Se utilizaron peces pequeños vivos, carne fresca de res y pescado. La forma de suministro en el caso de la carne, inicialmente fue a granel, sin embargo; hemos obtenido mejores resultados suministrando este alimento con una pinza individualmente. De esta forma uno se asegura de que todos los organismos coman en la misma proporción, aunque requiere de mayor tiempo para efectuarlo.

La alimentación con peces es la mejor opción para alimentar organismos de 8 meses en adelante; no obstante la obtención de este alimento es un poco problemática, ya que no siempre disponemos del tiempo para capturarlos y en los lugares donde los venden no son tan constantes. Una gran ventaja con los peces, es que este tipo de alimentación esta menos alejado del correspondiente al medio natural, además de que así se ahorra tiempo tanto en la alimentación como en la limpieza.

Limpieza

Se efectuó cada tercer día, inmediatamente después de la alimentación. Consistió en la eliminación completa del volumen existente y la sustitución con agua de la llave reposada, con lavados exhaustivos de cada pecera.

Cuando la alimentación consistió en peces, la limpieza se redujo a dos veces por semana.

Agrupación y Desoves

Una vez que los organismos se aclimataron a las condiciones de laboratorio, hacia finales de 1988 se agruparon de modo que cada pecera quedara con una proporción de 2 hembras por cada macho. Esta agrupación y la presencia de un sustrato para la ovoposición, así como el mantenimiento en cuanto a oxigenación, alimentación y limpieza permitió la obtención del primer desove en cautiverio en el periodo reproductivo 88-89, a partir de los primeros organismos recolectados.

En el periodo reproductivo 88-89 solo se presentó un desove en el mes de Marzo de 1989, con un total de 30 huevos fecundados, de los cuales se desarrollaron hasta la edad adulta 14 organismos. En el mes de Septiembre de 1989 se reagruparon los organismos adultos de modo que quedaran tres hembras por cada macho. El mantenimiento de cada grupo fue semejante al periodo anterior, excepto que en este caso se

tuvo especial atención en la aparición del comportamiento de cortejo, las interacciones hembra-macho, macho-hembra, la depositación del espermatóforo, la captura de este por la hembra y la ovoposición. Durante el periodo reproductivo 89-90 se presentaron 12 desoves durante los meses de Octubre de 1989 a Abril de 1990, con la mayor proporción en los meses de Noviembre y Diciembre, en la Fig. 17 se presentan los resultados.

Desarrollo embrionario

En cada desove la hembra deposita a los huevecillos fecundados envueltos en una masa gelatinosa amorfa sobre el substrato (piedras, plantas o la manguera de suministro de aire en las peceras). Cada huevecillo está rodeado por una capa concéntrica transparente de material nutritivo durante el desarrollo embrionario. Conforme el embrión crece, tal capa se adelgaza, hasta que se rompe por completo durante la eclosión de las larvas.

Para seguir este proceso se separaron algunos huevecillos recién fecundados de la masa gelatinosa amorfa para hacer observaciones más cercanas. Las observaciones se hicieron a través de un microscopio estereoscópico; se tomaron fotografías representativas de cada etapa (Fig. 18).

Las primeras divisiones celulares se observan en término de una o dos horas de haberse presentado el desove, el inicio de la diferenciación se presenta entre los días 2 y 4. La visualización de las branquias ocurre entre el día 7 y 8. Y la eclosión de las larvas se presenta entre el día 15 y 18. (Fig. 19).

Una vez que la eclosión de las larvas dió inicio fue necesario eliminar paulatinamente el exceso de substancia gelatinosa en la que estaba envuelto el desove, así como los huevos sin fecundar, para evitar el crecimiento de hongos. Cuando la eclosión de todo un desove concluyó, se eliminó el material correspondiente a los embriones que no se diferenciaron y el exceso de gelatina. Solamente se dejaron los restos del material envolvente de cada huevo, mismo que se fue adelgazando poco a poco y en el momento de la eclosión era mucho menos denso.

Reacomodo de larvas

Se colocaron 45 larvas por pecera (50x40x30 cm) con un nivel de 5 cm de solución de Holtfreter al 20 % modificada (pag. 52) (9, 24). El mantenimiento de larvas con esta solución evita la propagación de agentes infecciosos, principalmente bacterias y hongos. Cada pecera fue provista de aireación constante.

Alimentación y limpieza de larvas

Durante los primeros días posteclosión, la alimentación consistió en la gelatina restante del desarrollo embrionario, hasta que prácticamente toda la población eclosionó. Al quedar reagrupadas las larvas, su alimentación y limpieza, así como la

Desoves

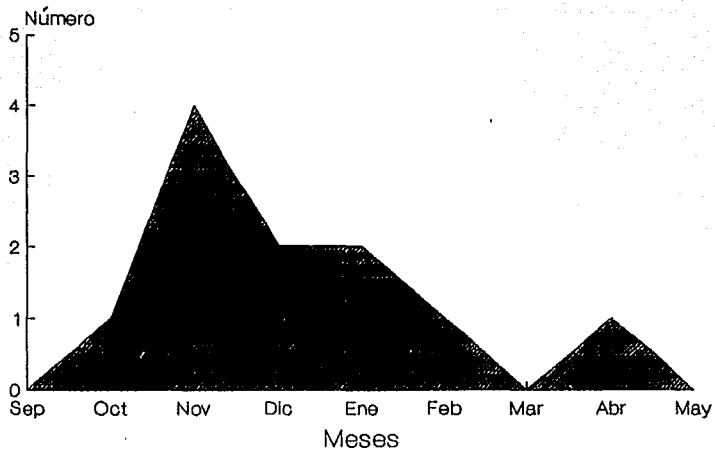


FIGURA 17. Número de desoves durante el período reproductivo 89-90 en la colonia de *Ambystoma mexicanum*. Cada desove con un promedio de 100 huevesillos fecundados.

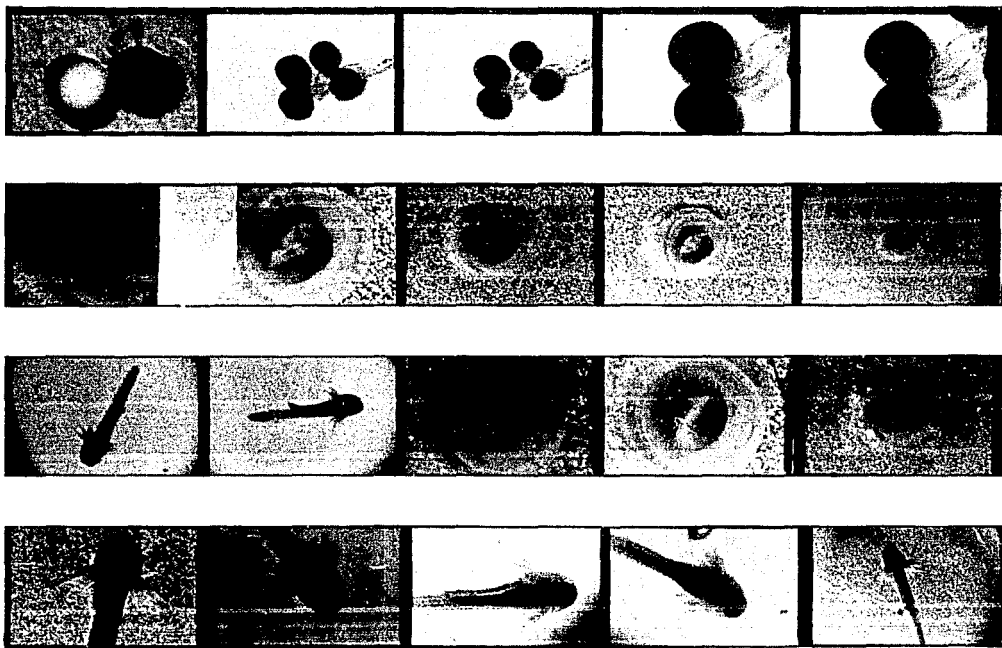


FIGURA 18. Fotografías en el microscopio estereoscópico, durante el desarrollo embrionario de A. mexicanum.

Desarrollo Embrionario

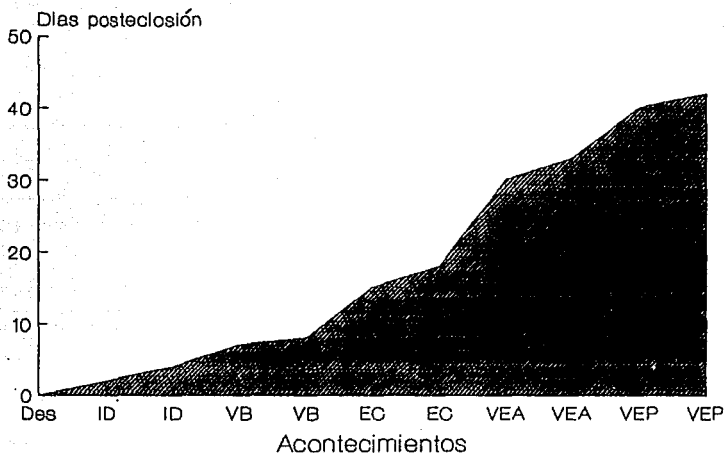


FIGURA 19. Duración del desarrollo embrionario en *Ambystoma mexicanum*. En el eje de las abscisas se indican los principales sucesos: ID=inicio de la diferenciación, VB= visualización de las branquias, EC= eclosión de larvas, VEA=visualización de las extremidades anteriores, VEP= visualización de extremidades posteriores. El eje de las ordenadas corresponde a la escala de tiempo. Se grafican los intervalos de tiempo en que se observan los cambios. Los resultados de esta gráfica corresponden a las observaciones proveniente de un total de 200 larvas.

cantidad de larvas por pecera fue variable, dependiendo de la edad. En la tabla 9 se resume la forma de mantenimiento de larvas durante las diferentes edades.

Tratamiento ante Infecciones

En las colonias de A. mexicanum establecidas en condiciones de laboratorio, un problema serio son las infecciones bacterianas, que pueden acabar con la población en pocas semanas. Varios signos clínicos se han descrito y se han propuesto diversas causas, sin embargo no existen métodos precisos para combatirlos y la mayoría de los tratamientos son dirigidos a organismos adultos (24, 91).

Durante el establecimiento de la colonia de A. mexicanum en nuestro laboratorio el problema en cuanto a enfermedades fue evidente principalmente en larvas, durante los primeros meses de edad. Por lo tanto se evaluó el efecto del tratamiento con antibióticos sobre el porcentaje de mortalidad de larvas en desarrollo. Se probó el efecto de antibióticos bajo diferentes condiciones. Los antibióticos utilizados fueron: penprocilina 1 Unidad/ml y estreptomina 1 mg/ml; en el medio donde se mantenían a las crías. La elección de los antibióticos fue en cierto sentido arbitraria, por la carencia de información referente a la aplicación de antibióticos en anfibios, en particular en larvas. Se consideró esta mezcla en base a su utilización para prevenir el crecimiento bacteriano en los medios de cultivo. (comunicación personal del Dr. Lino Diaz de León; IIBM, UNAM).

Se formaron 6 grupos (n=45 c/u) con larvas de 5 a 10 días posteclosión. Las condiciones fueron las siguientes: I= en agua de clorinada, II= solución Holtfreter al 20% modificada (9, 24), III= agua de clorinada con antibióticos, IV= agua de clorinada con antibióticos más anfotericina B (antimicótico), V= agua reposada con antibióticos más azul de metileno. VI= solución Holtfreter al 20%, antibióticos más azul de metileno. De los grupos I, II, y V se hicieron dos replicas.

En organismos de otro desove se probaron diferentes dosis de antibióticos en la condición IV. Se formaron 4 grupos (n=40) y las dosis probadas fueron: 0.5, 1, 2, y 4 U/ml y mg/ml de penprocilina y estreptomina respectivamente.

Los resultados obtenidos con los antibióticos se presentan en la Fig. 20. En A se muestra el porcentaje de mortalidad para los grupos I, II, III y V que fue de 97, 49, 24 y 12 % respectivamente, mientras que para el grupo IV fue de 5% y para el VI de 9%. Es claro que el efecto de los antibióticos es mayor si se aplican en presencia de solución Holtfreter. En presencia de anfotericina B y azul de metileno el efecto se suma. En B se muestran los resultados obtenidos con tres desoves en las condiciones I, II y V.

No observamos diferencias significativas al variar la dosis de antibióticos. En base a este resultado para prevenir las infecciones bacterianas de otros desoves hasta los tres meses de edad, decidimos utilizar la dosis mínima (condición IV).

TABLE 9. Formas de Mantenimiento de Larvas de Ambystoma mexicanum según la Edad.

ALIMENTACION	LIMPIEZA	TRATAMIENTO ANTE INFECCIONES
Pulga de agua diario Hasta 2 meses (n=45)	Eliminación de residuos sólidos cada 3 días y completa una vez a la semana.	PREVENTIVO (Penprocilina + estreptomycin + azul de metileno) Hasta los 3 meses
Artemia salina Cada tercer día Hasta 6-7 meses (n=25)	Eliminación de residuos sólidos cada 3 días y completa una vez a la semana.	
Peces pequeños vivos y/o carne fresca de res o pescado. Cada tercer día.	Eliminación de residuos sólidos cada 3 días y completa una vez a la semana.	
Hasta 8-9 meses (n=12) Peces pequeños eventualmente carne fresca de res o pescado dos veces por semana.	Completa, dos veces por semana. A partir de esta edad pueden mantenerse con plantas y arena, sin efectuar limpieza por periodos largos de tiempo.	CURATIVO (Nitrofurazón + acriflavina + azul de metileno).
9 meses en adelante n=5-6, dependiendo del tamaño.		

La cantidad de organismos en proceso de desarrollo en cada pecera debe mantenerse proporcional. Entre paréntesis se anota la cantidad de organismos a diferentes edades en una pecera con las siguientes dimensiones: 60x40x20 cm. Durante las primeras fases de desarrollo es recomendable mantener a las larvas en solución Holtfreter al 20 ó 50%, con lo que se reduce notablemente el índice de enfermedades.

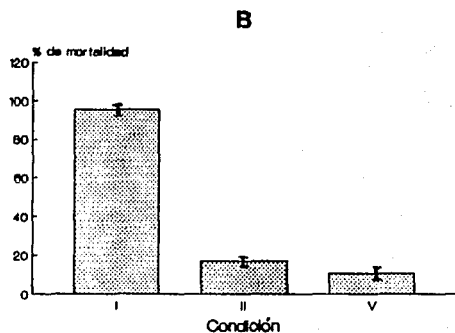
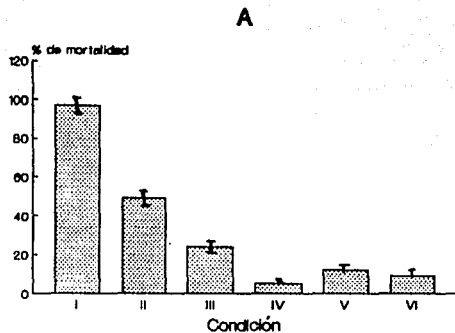


FIGURA 20. Efecto del tratamiento con antibióticos en larvas de *Ambystoma mexicanum*. Se incluyen las diferentes condiciones bajo las cuales se aplicaron los antibióticos. Los antibióticos se aplicaron a una concentración de 1 microgramo/ml en la solución de las pecera. En A se incluyen los resultados bajo las diferentes condiciones. Las condiciones de tratamiento fueron las siguientes: I=H₂O dechlorinada, II= Solución Holtfreter al 20%, III= H₂O dechlorinada + antibióticos, IV=H₂O dechlorinada + antibióticos + anfitericina B (antimicótico), V= H₂O dechlorinada + antibiótico + azul de metileno, VI= solución Holtfreter al 20% + antibióticos + azul de metileno. En B se muestran los resultados de 3 replicas de las conducciones I, II y V.

Comentarios sobre la colonia

A. mexicanum es una especie neoténica y sobre la cual se tiene poco conocimiento en relación a su ciclo de vida, su ecología y los factores que regulan los procesos de su estrategia de desarrollo (20, 154).

Como animal de experimentación ha logrado un amplio reconocimiento dentro de la comunidad científica internacional en estudios de biología del desarrollo, regeneración, genética, endocrinología, electrofisiología, etc., (154).

Desde el siglo pasado A. mexicanum fue llevado a diferentes países, en donde se formaron colonias en condiciones de laboratorio. En la actualidad se sabe de la existencia de múltiples variantes de esta especie resultantes de las cruces en laboratorio, prácticamente puede hablarse de cepas de laboratorio (8, 20, 78). El establecimiento de la colonia de A. mexicanum en nuestro laboratorio resulta de gran interés desde dos puntos de vista: 1) bajo estas condiciones se puede contar con material biológico de diferentes etapas de desarrollo que han sido mantenidos bajo condiciones controladas y de los cuales se conoce la edad; 2) por tratarse de una especie en peligro de extinción, el conocimiento de su biología en cautiverio, como la reproducción en sí misma, son factores que podrían contribuir a la planeación de proyectos sobre su preservación.

Un último punto respecto a la colonia es que debido a los cambios múltiples en la calidad del agua de suministro en las tuberías del laboratorio, en este año (1992) hemos cambiado la forma de mantenimiento de los organismos adultos. En primer lugar la alimentación ha consistido únicamente en peces pequeños vivos y prácticamente no se manipulan, puesto que las peceras han sido acondicionadas con plantas acuáticas y un fondo con arena oscura. Cada pecera contiene un filtro y dos sistemas de oxigenación: uno unido al filtro y otro libre. Las plantas las colectamos en los canales de Xochimilco y previo tratamiento se colocan en las peceras cada vez que es necesario; es decir cuando estas empiezan a tomar una coloración amarillenta y por el movimiento de los animales empiezan a desprender sus hojas. Además de los peces, también les suministramos acociles y plantas como fuente de alimento adicional, aunque a estos últimos los ingieren en proporción menor.

(**)

Composición de la solución Holtfreter (100%)

Solución A		Solución B	
NaCl	3.5 g	NaHCO ₃	0.2 g
KCl	0.05 g	H ₂ O destilada	500 ml
CaCl ₂	0.1 g		
H ₂ O	500 ml		

Se mezclan partes iguales de cada solución. Y la solución Holtfreter modificada lleva 204 mg de MgSO₄·7H₂O/l (9, 24).

Anexo II. Inducción de la Metamorfosis en A. mexicanum

INTRODUCCION

El desarrollo de los anfibios se divide en dos etapas generales para facilitar su estudio; la embriogénesis y la metamorfosis. Para anfibios anuros la determinación de los diferentes estados de desarrollo dentro de la embriogénesis y de la metamorfosis se han establecido con claridad (171). Incluso para anfibios urodelos se han elaborado diferentes tablas de embriogénesis (149). Sin embargo, para determinar las etapas de la metamorfosis en anfibios urodelos no hay métodos precisos ni prácticos (90, 124, 136).

Por otro lado la mayoría de los estudios tanto para determinar las etapas de la metamorfosis así como para inducirla en anfibios urodelos se han efectuado en A. tigrinum (90, 122).

Por lo tanto, para realizar el proyecto de tesis, fue necesario unificar los criterios tanto para inducir la metamorfosis en A. mexicanum así como para determinar las etapas de tal proceso mediante criterios morfométricos.

Se efectuó un experimento con el propósito de encontrar la dosis, vía y frecuencia de administración de T4 óptimas para inducir y reconocer las diferentes etapas de la metamorfosis en A. mexicanum.

Las formas de inducción de metamorfosis reportadas son variables y los resultados también; por ejemplo Tompkins et al., (172); utilizando larvas de A. mexicanum de 70 días de edad, induce metamorfosis por inmersión en agua con L-tiroxina 5×10^{-6} M.

Por otro lado, utilizando A. mexicanum adultos neoténicos Brandle y Stirling (19) inducen metamorfosis mediante la administración de 150 μ l de una solución 30 mM/ml de tiroxina; administrando tres inyecciones intraperitoneales a la semana, durante tres semanas.

En otro estudio efectuado con A. mexicanum adultos neoténicos (136) se utiliza una sola administración de 100 μ g/200 ml de tiroxina vía intraperitoneal y logra la metamorfosis completa entre 27 y 30 días post-inyección.

En todos los estudios mencionados, la inducción de la metamorfosis se efectuó con el objetivo final de tener organismos con metamorfosis completa, sin importar las etapas intermedias, por lo que dependiendo de las particularidades del estudio, el método de inducción de metamorfosis se elige en relación al tiempo en el que los investigadores requerían a los organismos metamorfoseados.

Para el estudio de la presente tesis se hacía necesario el conocimiento de la dosis adecuada, la vía y frecuencia de administración en A. mexicanum adultos, que permitiera determinar las etapas de la metamorfosis en esta especie mediante criterios morfométricos; puesto que los objetivos del estudio no solamente se enfocaban a los extremos de

la metamorfosis sino al análisis de las etapas intermedias también.

MATERIAL Y METODOS

En primer término, se decidió considerar la dosis de administración en relación al peso corporal para unificar la dosis neta que cada animal recibiría. Esto con el propósito de controlar el momento de la respuesta y la duración de la metamorfosis. La alta tasa de variaciones respecto a la capacidad de respuesta de cada animal en los estudios antes mencionados podría deberse en gran medida a que se administró una dosis general a todos los animales, sin considerar la variabilidad en peso. En el caso del método por inmersión la variabilidad es mayor. Por lo que se decidió unificar la dosis en relación al peso corporal de cada animal y se eligieron dos formas de administración, 4 dosis y dos diferentes frecuencias de administración, lo que se hizo en base a otros estudios y hasta cierto punto de forma arbitraria puesto que para A. mexicanum los datos reportados son más escasos.

Marcaje de los animales

Se utilizaron 20 organismos sexualmente maduros de los cuales 10 fueron donados generosamente por el Circulo de Ciencias del CCH Naucalpan en Junio de 1988 y los otros 10 resultantes de nuestra colonia. Se formaron 5 grupos cada uno constituido por 4 organismos. Uno de los grupos correspondió al grupo control y los otros cuatro a los experimentales.

Para la evaluación del desarrollo de la metamorfosis y reconocimiento de sus etapas en cada organismo fue necesario identificar claramente cada uno. Teniendo como referencia las formas de marcaje en otros anfibios, antes de iniciar este experimento se determinó la forma más efectiva para marcarlos sin ocasionarles daño. Se probó con alambre telefónico de diferentes colores, colocado en torno al cuello; con una marca numérica (como un sello) sobre la piel en la parte ventral; con los números de alambre enfriados en hielo seco o nitrógeno líquido. Y con hilo de algodón de diferentes colores.

De estos tres sistemas, el más efectivo fue la colocación de un collar de hilo de algodón de diferentes colores en torno a la cabeza, justo detrás de las branquias lo suficientemente flojo como para no dañar la piel de los animales y lo suficientemente tenso como para que los animales no lo eliminaran.

Inducción de la metamorfosis

A. mexicanum es una especie neoténica que normalmente no se metamorfosea a menos que se induzca de manera experimental mediante la administración de hormonas tiroideas o TSH.

Para la realización de este estudio, la metamorfosis en A. mexicanum se indujo mediante la administración de L-tiroxina, puesto que se considera que el mecanismo inicial para

desencadenar la metamorfosis se logra mediante la acción inicial de esta hormona (123).

En este estudio se analizó el efecto de 4 diferentes dosis totales y dos vías de administración.

I. 2.5 microgramos de T4/g. Una sola administración intraperitoneal (ip). Esta dosis se calculo en base al estudio de Prahlad, 1965; en el que se trabaja con organismos A. mexicanum de un peso corporal promedio de 40 g. administrando 100 microgramos de T4/200 microlitros/animal.

II. 2.5 microgramos de T4/g . 9 inyecciones i.p. en total. Una cada tercer día, durante 3 semanas. El estudio de Brandle, (19), también utiliza organismos neoténicos A. mexicanum y la metamorfosis se logra en un periodo de dos semanas. Sin embargo la dosis que utilizan (30 mM/ml, 150 microlitros/animal), 9 administraciones, una cada tercer día. La cantidad total de T4 administrado con este esquema sería de 3.5 mg de T4 por inyección; cantidad que nos pareció excesiva. Por lo tanto adoptamos el esquema seguido por Brandle, (19) en cuanto a la frecuencia de administración, pero con la dosis propuesta por Prahal, 1965.

III. 25 microgramos de T4/g. 7 inyecciones i.p. Una cada tercer día. Este tercer grupo se trato con la misma frecuencia y vía de administración que en II, pero con una dosis 10 veces mayor. La cantidad total recibida por cada animal sigue siendo menor que la propuesta por Brandle, 1975.

IV. 75 microgramos de T4/g. Una sola administración por intubación gástrica. Suponiendo que la vía de administración podría cambiar la velocidad de acción de la hormona.

V. Grupo control: los animales de este grupo recibieron el volumen equivalente de solución Ringer para anfibios, en las mismas vías y frecuencias de cada grupo experimental correspondiente.

Como ya se ha mencionada la adquisición del material biológico tiene algunas restricciones, y si bien para el momento en que se desarrolló este experimento ya contabamos con organismos provenientes de la colonia, reservamos una cantidad suficiente para el experimento definitivo, por lo que para el experimento preliminar solo se consideró un organismo control para cada una de las estrategias de inducción para evaluar si la manipulación diaria para la medición de los parámetros morfométricos, podría influir en el proceso de metamorfosis.

Parámetros morfométricos

A partir del día cero (primer día en que se administra la hormona) para cada animal se hicieron las siguientes mediciones: longitud total, longitud de aleta dorsal, longitud de branquias, ancho aleta caudodorsal y peso corporal. Las

mediciones fueron hechas por la misma persona y con la misma regla todos los días. Al final del experimento se calcularon los porcentajes de reducción de cada parámetro y se definieron 5 etapas de la metamorfosis.

La limpieza y alimentación durante el experimento fue semejante al descrito en material y métodos de la colonia.

Resultados

1. Los organismos control no presentaron indicios de metamorfosis, exceptuando una ligera reducción de branquias al principio del experimento. Los organismos de este grupo ganaron peso corporal.

2. Todos los organismos experimentales presentaron metamorfosis.

3. Con la administración intragástrica el estrés provocado en los animales suele ser considerablemente mayor durante la administración. Por otro lado el desarrollo de la metamorfosis fue mucho más lenta que en los otros métodos. Entre el segundo y doceavo día postestímulo, la reducción de branquias no fue más allá de 5%. La metamorfosis terminó entre el día 28 y 30 postestímulo.

4. Con la dosis de 25 microgramos de T4/g, la metamorfosis se desencadenó y terminó más rápido, de modo que hacia el octavo día la reducción había alcanzado un 40%, al décimo día la reducción llegó a un 60% y hacia el doceavo día postestímulo, la metamorfosis prácticamente se completó.

5. Con la dosis de 2.5 microgramos de T4/g 9 inyecciones se obtuvo un perfil muy semejante al anterior aunque menos rápido. Hacia el octavo día la reducción de los parámetros llegó al 25 %, hacia el día 10 a un 42% y la metamorfosis terminó hacia el día 18.

6. Por último la estrategia I (2.5 microgramos de T4/g) una sola administración presentó un perfil más gradual y coherente. Bajo esta estrategia resultó más fácil definir las etapas de la metamorfosis.

En la Fig. 21 se resumen los resultados respecto a la longitud de branquias de los cuatro grupos experimentales y el control. La reducción de la longitud de branquias es uno de los principales parámetros a considerar para la definición de las etapas de la metamorfosis en este experimento puesto que es una estructura que puede seguirse a lo largo de todo el proceso, la eliminación completa de branquias es el criterio para dar por terminada la metamorfosis.

En base a esta estrategia en el primer experimento se distinguieron 5 etapas de la metamorfosis con las siguientes características:

Efecto de diferentes dosis de T4 sobre la longitud de branquias

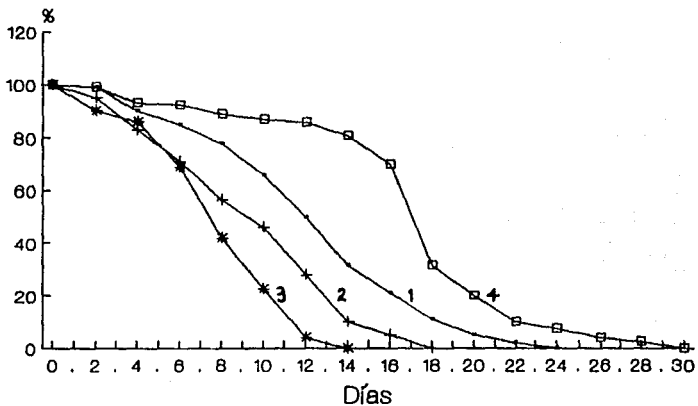


FIGURA 21. Porcentajes de reducción de la longitud de branquias durante la metamorfosis T4-inducida en *Ambystoma mexicanum* con diferentes métodos. 1=2.5 microgramos/g una sola administración ip, 2=2.5 microgramos/g, 9 administraciones ip, una cada tercer día, 3=25 microgramos/g, 7 administraciones ip, una cada tercer día, 4=75 microgramos/g una administración mediante intubación gástrica.

Etapa	% de decremento	Parámetro
I	5-15	los 5 parámetros
II	20-30	" " "
III	40	longitud de branquias
IV	80	" " "
V	100	" " "

Observaciones y comentarios generales de este experimento.

Uno de los principales aportes de este experimento fue el aprendizaje que obtuvimos sobre la manipulación y manejo de los animales; desde cómo marcarlos, cómo medirlos, cómo alimentarlos y mantenerlos durante la metamorfosis. Fue posible determinar la dosis y vía de administración óptima para inducir la metamorfosis y reconocer las etapas en Ambystoma mexicanum.

En el experimento definitivo se reconsideraron los criterios para determinar las etapas de la metamorfosis, incluyendo los criterios de Norman, 1985 sobre las etapas de metamorfosis en A. tigrinum. Se consideraron los siguientes criterios: la longitud de branquias, la proporción entre la aleta ventral y la aleta dorsal así como el ancho de la aleta ventral con respecto al ancho total de la cola. En la sección correspondiente de esta tesis se señalan las equivalencias entre las etapas metamórficas en A. tigrinum y A. mexicanum (pag. 6).

Quedaron establecidas 4 etapas en base a los tres criterios arriba mencionados y no únicamente en base a la reducción de branquias. La etapa I y II del primer experimento se incluyeron en la etapa I del experimento definitivo, por el hecho de que las diferencias en cuanto a la reducción de los parámetros morfométricos en este intervalo no son tan marcadas y era necesario definir claramente el momento del sacrificio para evaluar la concentración cerebral e hipofisiaria de las ENKs y lograr el objetivo central.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aceves C., Legarreta FG. y Valverde-R C. (1982). Importancia del radioinmunoanálisis homólogo de tiroxina en el suero de bovinos y caprinos. *Veterinaria Méx.* 13:207-212.
2. Agnati L., Benfenati P., Cortelli R., D'Alessandro R., Chisoli E. and Zampa G. (1979). A study on the effects of interaction between naloxone and 2-Br-a ergocriptine or clonidine on luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin and thyroid-stimulating hormone levels in normal man serum. *Neurosc. Letters* 12:307-311.
3. Akil H., Watson S., Yung E., Lewis M., Khachaturian H. and Walter J. (1984). Endogenous opioids: Biology and Function. *Ann. Rev. Neurosc.* 7:223-255.
4. Allen B. (1938). The endocrine control of amphibian metamorphosis. *Biol. Rev.* 13:1-19.
5. Allen B. (1918). The results of thyroid removal in larvae of Rana pipiens. *J. Exp. Zool.* 24:499-519.
6. Alumets J., Hakanson R., Sundler F. and Thorell J. (1979). Neuronal localization of immunoreactive enkephalin and beta-endorphin in the earthworm. *Nature* 279:805-806.
7. Al Zei M., Lutz-Bucher B. and Koch B. (1986). Modulation by Leu-enkephalin of peptide release from perfused neurointermediate pituitary. *Neuroendocrinol.* 42:248-254.
8. Armstrong B. (1987). Directory of axolotl colonies. *Axolotl Newsletter* 6:6-14. Indiana University Axolotl Colony.
9. Armstrong J., Duhon S. and Malacinski G. (1989). Rasing the axolotl in captivity. In: *Developmental biology of the axolotl.* (Armstrong J. and Malacinsky G. Eds.). Oxford University Press. New york.
10. Armstrong J. and Gillespie L. (1981). Induced spawning and artificial insemination in the axolotl. *Axolotl. News Letter* 10:1-14.
11. Asai M., Cano A., Talavera E. and Zubieta M. (1988). Ir-Met and IR-Leu-enkephalin content in the Axolotl brain (Ambystoma mexicanum). *Neuropeptides* 12:41-42.
12. Balinsky B. y Fabian B. (1983). *Introducción a la embriología*; Cap. 18. Ediciones Omega. Barcelona España.
13. Barchas J., Akil H., Elliot G., Holman R. and Watson S. (1978). Behavioral neurochemistry neuroregulators and behavioral states. *Science* 200:964-973.

14. Bhargava H. and Das S. (1986). Evidence for opiate action at the brain receptors for thyrotropin-releasing hormone. *Brain Res.* 368:262-267.
15. Bayón A., Koda L., Battenberg E., Azar R. and Bloom F. (1980). Regional distribution of endorphin, met-enkephalin and leu-enkephalin in the pigeon brain. *Neurosci. Lett.* 16:75-80.
16. Baker B. and Tata J. (1992). Prolactin prevents the autoinduction of thyroid hormone receptor mRNA during amphibian metamorphosis. *Ann. Physiol.* 149:463-467.
17. Bentley P. (1976). *Comparative vertebrate endocrinology.* Cambridge University Press. London. 415 pages.
18. Bern H., Nicol C. and Strohman R. (1967). Prolactin and tadpole growth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126:518-520.
19. Brandle K. and Stirling R. V. (1975). Development of the ipsilateral visual projection in axolotls treated with thyroxine. *J. Physiol. (Lond)* 250:28-29.
20. Brandon R. (1989). Natural history of the axolotl and its relationship to other ambystomatid salamanders. In: *Developmental biology of the axolotl.* pp:113-1121. (Armstrong J. and Malacinski G. Eds.). Oxford University Press. New York.
21. Brandon R. (1970). Size range, size at maturity, and reproduction of Ambystoma dumerilli (Duges), a paedogenetic mexican salamander, endemic to lake Patzcuaro, Michoacan. *Copeia*:385-386.
22. Brauth S. (1984). Enkephalin-like immunoreactivity within the telencephalon of the reptile Caiman cocodrilus. *Neurosci.* 11 (2):345-358.
23. Brecha N., Karten H. and Laverack c. (1979). Enkephalin-containing amacrine cells in the avian retina. Immunohistochemical localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:3010-3014.
24. Brothers A. (1977). Instructions for the care and feeding of axolotls. *Axolotl Newsletter* 3:9-16
25. Broyles R. (1981). Changes in the bloom during amphibian metamorphosis. In: L. I. Gilbert and E. Frieden (eds.). *Metamorphosis. A problem in Developmental Biology.* 2nd Edition. N. Y. Plenum Press, pp 461-490.
26. Bruni J., Vught D., Marshall S. and Meites J. (1977). Effects of naloxone, morphine and methione enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. *Life Sci.* 21:461-466.

27. Buchan A. (1986). An immunocytochemical study of regulatory peptides in the amphibian gastrointestinal tract, and brain. *Can. J. Zool.* 64:1-7.
28. Buscaglia M., Leloup J. and Luze A. (1985). The role and regulation of monodeiodination of thyroxine to 3, 5, 3', triiodothyronine during amphibian metamorphosis. In: *Metamorphosis*. (M. Balls and Bowes, eds.). Clarendon Press. Oxford, pp:273-293.
29. Cano A. (1987). *Biosíntesis de encefalinas en el cerebro del ajolote (Ambystoma mexicanum)*. Tesis Profesional de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
30. Cano-M A., Vargas-G A., Matamoros-T G., Anton-Tay F. and Asai M. (1990). Regional brain and pituitary enkephalins changes with age and metamorphosis in Ambystoma tigrinum. *Soc. Neurosci.* 16:867.
31. Cano-M. A., Vargas-G A., Matamoros-T G. y Asai M. (1991) El axolotl, Ambystoma mexicanum. Una especie endémica del valle de México en peligro de extinción. Una propuesta alternativa para su preservación. Mem. del III Congreso Internacional de Recursos Naturales y Vida Silvestre. The Wild life Soc. Mayo 1991.
32. Carr J. and Norris D. (1990). Immunohistochemical localization of corticotropin-releasing factor and arginine vasotocin-like immunoreactivities in the brain and pituitary of the american bullfrog (Rana catesbiana) during development and metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 180-188.
33. Carr J. and Norris D. (1988). Interrenal activity during metamorphosis of the tiger salamander Ambystoma tigrinum. *Gen. Comp. Endocrinol.* 6:491-500.
34. Chaminade M., Foutz A. and Rossier J. (1984). Co-release of enkephalins and precursors with catecholamines from the perfused cat adrenal gland in situ. *J. Physiol.* 353:157-169.
35. Cocchi D., Santagostino A., Gil-Ad I., Ferri S. and Muller E. (1977). Leu-enkephalin-stimulated growth hormone and prolactin release in the rat: Comparison with the effect of morphine. *Life Sci.* 20:2041-2045.
36. Cohen P. (1970). Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis. *Science* 168:533-543.
37. Con R. and Goldstein A. (1982). A dynorphin-like opioid in the central nervous system of an amphibian. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:3345-3349.

38. Conlon J., Ballam M. and Lamberts R. (1985). regulatory peptides: glucagon, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide in the brain and gastrointestinal tract in Ambystoma mexicanum. Gen. Comp. Endocrinol. 58:150-159.
39. Cockcrum E. y McCauley W. (1965). Zoologia. Nueva Editorial Interamericana. México. pp: 513-525.
40. Darras M. and Kuhn E. (1984). Difference of the in vitro responsiveness to thyrotropin stimulation between the neotenic and metamorphosed axolotl, Ambystoma mexicanum: failure of prolactin to block the thyrotropin-induced thyroxine release. Gen. Comp. Endocrinol. 56:321-325.
41. Darras M. and Kuhn E. (1983). Effects of TRH, bovine TSH, and pituitary extracts on thyroidal T4 release in Ambystoma mexicanum. Gen. Comp. Endocrinol. 51:286-291.
42. Darras M. and Kuhn E. (1982). Increase plasma levels of thyroid hormones in a frog Rana ridibunda following intravenous administration of TRH. Gen. Comp. Endocrinol. 48:469-475.
43. Deviche P., Lowry C. and Moore F (1989). Opiate control of spontaneous locomotor activity in a urodele amphibian. Pharm. Biochem. Behav. 34:753-757.
44. Dood J., Follett B. and Sharp P. (1971). Hypothalamic control of pituitary function in submammalian vertebrates. Comp. Physiol. Biochem. 4:113-223.
45. Ducibela T. (1974a). Ocurrance of biochemical metamorphic events without anatomical metamorphosis in the axolotl. Dev. Biol. 38:175-186.
46. Duellman W. and Trueb L. (1986). Biology of Amphibians. McGraw-Hill Book Company. N. Y. pp: 173-194.
47. Duka T., Suttman H., Dorow R., Doenicke A and Hohe M. (1986). Changes in prolactin and growth hormone secretion, induced by an agonist-antagonist opioid, nalbuphine. Brit. J. Clin. Pharmacol. 21:611-612.
48. Edley S., Hall L., Herkenham M. and Pert C. (1982). Evolution of striatal opiate receptors. Brain Res. 249:184-188.
49. Eldred W. and Karten H. (1985). Ultrastructure and synaptic contacts of enkephalinergic amacrine cells in the retina of turtle (Pseudemys scripta). J. Comp. Neurol. 232:36-42.
50. Eiden L. (1987). The enkephalin-containing cell: strategies for polypeptide synthesis and secretion throughout the neuroendocrine system. Cel. Mol. Neurobiol. 7(4):339-352.

51. Eisthen H., Sengelaub and Alberts J. (1990). Vomeronasal systems during aquatic phases in salamanders with differing life-histories. *Soc. Neurosci.* 55:14.
52. Etkin W. (1963). Metamorphosis-Activating system of the frog. Thyroid hormone feedback matures the neurosecretory mechanisms, coordinates the phases of metamorphosis. *Science* 139: 810-814.
53. Etkin W. (1970). The endocrine mechanism of amphibian metamorphosis. an evolutionary achievement. *Soc. Endocrinol.* 18:137-153.
54. Etkin W. and Gona A. (1967). Antagonism between prolactin and thyroid hormone in amphibian development. *J. Exp. Zool.* 165:249-258.
55. Frederikson R. (1977). Minireview. Enkephalin pentapeptides. A review of corrent evidence for a physiological role in vertebrate neurotransmission. *Life Sci.* 21:23-42.
56. Frieden E. (1968). Biochemistry of amphibian metamorphosis. in W. Etkin and L.I. Gilbert (eds). *Metamorphosis. A. Problem in Developmental Biology.* N. Y. Appleton-Centruy-Crofts. pp 349-398.
57. Futuyma D. (1979). *Evolutionary Biology.* Sinaver Associates Press. USA.
58. George D. and Dubois M. (1984). Methionine-enkephalin-like immunoreactivity in the nervous ganglion and the ovary of a protochordate. *Ciana intestinalis.* *Cell. Tiss. Res.* 236:165-170. chec vol.
59. Gilbert L. and Frieden E. (Eds.). (1981). "Metamorphosis: a problem in developmental biology". Plenum Press, New York.
60. Goldstein A., Lowney I. and Pal K. (1971). Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener, levorphanol in subcelualr fractions of mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68:1742-1747.
61. Gona A. and Etkin W. (1970). Inhibition of metamorphosis in Ambystoma tigrinum by prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 14:589-591.
62. Gonzalez A., Camarillo J.L., Mendoza F. and Mancilla M. (1986). Impact of expansion of human population on the herpetofauna of the Vallely of Mexico. *Herp. Rev.* 17:30-31.
63. Grandison L. and Guidotli A. (1977). Regulation of prolactin release by endogenous opiates. *Nature. Lond.* 270:357-359.

64. Greenberg M. and Prince D. (1983). Invertebrate neuropeptides: Native and naturalized. *Ann. Rev. Physiol.* 40:271-288.
65. Gross J. and Nagai Y. (1965). Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54:1197-1204.
66. Gros C., Pradelles P., Pouget C., Bepoldin O. and Dray F. (1978). Radioimmunoassay of methionine and leucine-enkephalins in regions of rat brain and comparison with endorphins estimated by a radioreceptor assay. *J. Neurochem.* 31:29-39.
67. Gruberg E. and Harris W. (1981). The serotonergic somatosensory projection to the tectum of normal and eyeless salamanders. *J. Morphol.* 170:55-69.
68. Gruberg E. and Solish S. (1978). The relationship of a monoamine fiber system to a somatosensory tectal projection in the salamander Ambystoma tigrinum. *J. Morphol.* 157:137-150.
69. Gudernatsch F. (1912). Feeding experimets on tadpoles. *Roux Arch.* 35:457-483.
70. Gutiérrez R. and Asai M. (1991). Ir-met and Ir-leu-enkephalin content in the periesophageal ganglia of Helix aspersa seasonal variations. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C (3):609-613.
71. Herrick J. (1965). The brain of tiger salamnder. Ambystoma tigrinum. The University of Chicago Press. Chicago, USA.
72. Houillon C. (1973). Desarrollo de los anfibios. En: *Embriología*. Ediciones Omega. Barcelona España. pp:31-54.
73. Holtt V. (1986). Opioid peptides processing and receptor selectivity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26:59-77.
74. Hughes J. (1983). Biogenesis, release and inactivation of enkephalins and dynorphins. *Br. Med. Bull.* 39:17-24.
75. Hughes J. (Ed). (1983). Opiate peptides. *Br. Med. Bull.* 39:1-106.
76. Hughes J. (1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphin. *Brain Res.* 88:295-306.
77. Hughes J., Smith T., Kosterlitz H., Fothergill L., Morgan B. and Morris H. (1975). Identification of two pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577-579.

78. Humprey R. (1977). History of the Indiana Univ. Axolotl Newsletter 1:1-10. Indiana University Axolotl Colony.
79. Iversen L., Iversen S. and Bloom F. (1980). Opiate receptors influence vasopressin release from nerve terminals in rat neurohypophysis. Nature Lond. 248:350-351.
80. Jackson I. and Reichlin S. (1974). Tryptotropin- releasing hormone (TRH). Distribution in hypothalamic and extrahypothalamic brain tissue of mammalian and submammalian chordates. Endocrinol. 95:854-862.
81. Jacob J. (1982). Endogenous morphines and pain control. Panminerva Medica-Europa Medica 24 (2):155-159.
82. Jacobs G., Michielsen R. and Kuhn E. (1988). Thyroxine and triiodo thyronine in plasma and thyroids of the neotenic and metamorphosed axolotl. Ambystoma mexicanum. Influence of TRH injections. Gen. Comp. Endocrinol. 20:145-151.
83. Jaros P., Dircksen H. and Keller R. (1985). Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and other nervous structures in the eyestalk of the shore crab, Carcinus maenas. (Crustacea decapoda). Cell. Tiss. Res. 241:111-117.
84. Kilpatrick D., Howells R., Laham H-M. and Udenfriend S. (1983). Evidence for a proenkephalin-like precursor in amphibian brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:5772-5775.
85. King J. and Millar R. (1981). TRH, GH-RIH and LH-RH in metamorphosis Xenopus laevis. Gen. Comp. Endocrinol. 44:20-27.
86. Kosterlitz H. (1979). Possible physiological significance of multiple endogenous opioid agonists. In: Mechanisms of pain and analgesic compound. pp:207-214. Ber. R.F. and Basset E. G. (eds). Raven Press N. Y.
87. Kramarova L., Kolaeva S., Yukhananov R. and Rozhanets V. (1983). Content of enkephalin and ACTH in some tissue of some tissue of active and hibernating ground squirrels (Citellus suslicus). Comp. Biochem. Physiol. 74C:31.33.
88. Kuhn E. and Jacobs F. (1989). Metamorphosis. In: Developmental Biology of Axolotl. Edited by Armstrong J. and Malacinski G. Oxford University Press. New York.
89. Lamers W. Mooren P., Graaf A., and Charles R. (1982). Enzyme clusters during the metamorphosis period of Ambystoma mexicanum: Role of thyroid hormone. J. Exp. Zool. 223:123-132.
90. Larras-Regard E., Taurong E. and Dirris M. (1981). Plasma T4 and T3 levels in Ambystoma tigrinum at various stages of metamorphosis. Gen. Comp. Endocrinol. 43:443-450.

91. Larry M. (1980). *Diseases Introduction. Axolotl Newsletter* 9:2-5.
92. Leake D, Crow R and Burnstok G. (1986). Localization of substance P-, Somatostatin-, Vasoactive intestinal polipeptide and Met-enkephalin-immunoreactive of the leech (Hirudo medicinalis). *Cell. Tiss. 243:345-351.*
93. Leboulenger F., Charnay Y., Dubois P., Rossier J and Vaudry H. (1984). Presence of proenkephalin in chromaffin cells of the frog adrenal gland. *Neurochem. Int.* 6:773-777.
94. Leboulenger F., Cupo A., Castanas E., Benyamina M., Pelletier G. and Vaudry H. (1986). Immunohistochemical and biochemical evidence for the presence of the pentapeptide met-enkephalin and the heptapeptide met-enkephalin-Arg6-Phen7 but not the octapeptide Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 in amphibian chromaffin cells. *Neurochem Int.* 8(3):303.309.
95. Leboulenger F., Leroux P., Dalerue C., Tonon M., Charnay Y., Dubois P., Coy D. and Vaudry H. (1983). Co-localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) and enkephalins in chromaffin cells of adrenal gland of amphibian stimulation of corticosteroid production by VIP. *Life Sci.* 32:375-383.
96. León-O M., Sánchez-A M., Piña A-L. and Bayón A. (1991). Evidence for enkephalin- and endorphin. immunoreactive cells in the anterior pituitary of the axolotl Ambystoma mexicanum. *J. Comp. Neurol.* 305:412-420.
97. Leung M and Stefano G. (1983). Isolation of molluscan opioid peptides. *Life Sci.* 33 (suppl 1): 77-80.
98. Lewis R. and Stern A. (1983). Biosynthesis of the enkephalin and the enkephalin-containing polypeptides. *Amm. Rev. Pharmac. Tox.* 23:353-372.
- Lien E., Finechel R., Garsky V., Sarantakis D. and Grant N. (1976). Enkephalin-stimulated prolactin release. *Life Sci.* 19:837-840.
100. Lindberg I. and White L. (1986). Reptilian Enkephalin: Implications for the evolution of proenkephalin. *Ach. Biochem. Biophys.* 245 (1). 1-7.
101. Linoilla R., Diaugustine R., Hervonen A. and Miler R. (1980). Distribution of Met- and Leu-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience* 5:2247-2259.
102. Lorenz H. and Kemali M. (1981). Substance P-, (Met) enkephalin- and somatostatin-like immunoreactivity distribution in the frog spinal cord. *Neurosci. Lett.* 26:119-124.

103. Lord J., Waterfield A., Hughes J. and Kosterlitz J. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature Lond.* 267:495-499.
104. Malcom S. (1984). *Fisiología animal. Principios y adaptaciones al medio ambiente. Tercera impresión. (CECSA), Mexico. 747 pags.*
105. Mancillas J., McGinty J., Selverston A., Karten and Bloom F. (1981). Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurons of lobster. *Nature* 293:576-578.
106. Martens G. and Herbert E. (1984). Polymorphism and absence of leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in Xenopus laevis. *Nature* 310:251-254.
107. Martin W., Eades C., Thomson J., Hupper R and Gilbert P. (1976). The effects of morphine and nalorphine-like drugs in independent and morphine dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197:517-532.
108. Maysinger D., Vermes I., Tilders F., Seizinger B.R., Gramsch C., Holt V. and Herz A. (1984). Differential effects of various opioid peptides on vasopressin and oxytocin release from the rat pituitary in vitro. *Naunyn-Schmiedber's Arch. Pharmacol* 328:191-195.
109. Miller R. (1981). Peptides and neurotransmitters: Focus on the enkephalins and endorphins. *Pharmacol. Ther.* 12:73-108.
110. Miller R. and Cuatrecasas (1978). Enkephalins and Endorphins. *Vitamins and Hormones* 36:297-383.
111. Miller R. and Pickel V. (1980). The distribution and functions of the enkephalins. *J. Histochem. Cytochem.* 28:908-917.
112. Miltner M. and Armstrong J. (1983). Spermatogenesis in the mexican axolotl, Ambystoma mexicanum. *J. Exp. Zool.* 227:255-263.
113. Model P. and Wurzelmann (1982). Vestibular axons from synapses on abnormally derived Muthner cell. *Develop. Brain. Res.* 3:123-129.
114. Morley J., Baranetsky N., Wingert T., Carlson H., Hershman J., Melmed S., Levin S.M., Jamison., Weitzman R., Chang J. and Varner A. (1980). J. Endocrine effects of naloxone-induced opiate receptor blockade. *Cli. Metab.* 50:251-255.
115. Morley J., Elson M., Levine A. and Shafer R. (1982). Levels of immunoreactive dynorphin in brain and pituitary of hyperthyroid and hypothyroid rats. *Europ. J. Pharmacol.* 78:125-127.

116. Mudge A., Leeman S. and Fisch G. (1979). Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:526-530.
117. Munro A. (1939). Nitrogen excretion and arginase activity during amphibian development. *Biochem. J.* 33:1957-1965.
118. Naik D., Sar M. and Stumpf W. (1981). Immunohistochemical localization of enkephalin in the central nervous system and pituitary of the lizard, Anolis carolinensis. *J. Comp. Neurol.* 198:581-601.
119. Negri M., Tonnarini G., Lezoche E., Mariani P., Sutherland J., Martino R. and Tamburrano G. (1986). Intravenous TRH administration dramatically enhances plasma MET-enkephalin. *IRCS Med Sci.* 14:1127-1128
120. Nicoll C. (1974). Physiological actions of prolactin. In "Handbook of physiology" (E. Knobil and W. H. Sawyer, Eds.) Section 7 (4), part 2, pp.253-292. *Am. Physiol. Soc. Washington DC.*
121. Nicoll R., Malenka R. and Kaver J. (1990). Functional comparison of neurotransmitter receptors subtypes in mammalian central nervous system. *Physiological Review.* 70:513-565.
122. Norman F. (1985). A practical method for staging metamorphosis in the tiger salamander Ambystoma tigrinum. *Anat. Record.* 211:102-109.
123. Norris D. and Gern A. (1976). Tiroxine-induced activation of hypothalamo-hypophysial axis in neotenic salamander larvae. *Science* 194:525-526.
124. Norris D., Jones E. and Crieley B. (1973). Pituitary prolactin levels in larval, neotenic and metamorphosed salamanders (Ambystoma tigrinum). *Gen. Comp. Endocrinol.* 20:437- 442.
125. Norris D. O. (1978). Hormonal and environmental factors involved in the determination of neoteny in urodeles. In *Comparative Endocrinology* (P. J. Gaillard and H. H. Boer eds.) Elsevier North-Holland, Amsterdam, pp:109-112.
126. Northcutt R. (1990). The lateral line system of the axolotl. *Axolotl Newsletter; Indiana University Colony.* 19:5-14.
127. Opdam P. and Niewenhuys R. (1976). Topological analysis of the brain stem of the axolotl Ambystoma mexicanum. *J. Com. Neurol.* 165:285-306.

128. Orozco A., Ruiz-J a: Valverde-R. C. The importance of employing homologous serum free of thyronines in radioimmunoassays to assess circulating thyroid hormones in Rainbow trout. Biol. Estud. Méd. Biol. Méx. En prensa. R 40, 1993.
129. Pasterson S., Robson L. and Kosterlitz H. (1983). Classification of opioid receptors. Br. Med. Bull. 39:31-32.
130. Pert C. and Snyder S. (1973). Opiate receptors: Demonstration in nervous tissue. Science 179:1011-1014.
131. Pezalla P. and Stevens C. (1984). Behavioral effects of morphine levorphanol, dextrorphan and naloxone in the frog Rana pipiens. Pharmacol. Biochem. Behav. 21:213-217.
132. Piccoli R., Melck D., Spagnuolo A., Vescia S. and Zanetti L. (1985). Endogenous opioids in marine invertebrates. Com. Biochem. Physiol. 80:237-240.
133. Platt J. and Christopher M. (1977). Effects of prolactin on the water and sodium content of larval tissues from neotenic and metamorphosis Ambystoma tigrinum. Gen. Comp. Endocrinol. 31:243-248.
134. Platt J. and LiCause M. (1980). Effects of oxytocin in larval Ambystoma tigrinum: Acceleration of induced metamorphosis and inhibition of the antimetamorphic action of prolactin. Gen. Comp. Endocrinol. 41:81-95.
135. Plotnikoff P., Mury J., Miller C., Coder N and Faith E. (1985). Enkephalins: Immunomodulators. Fed. Proc. 44 (1):118-122.
136. Prhald V. and Delaney E. (1965). A study of induced metamorphosis in the axolotl. J. Exp. Zool. 160:137-146.
137. Reaves T. and Hayward J. (1979). Immunocytochemical identification of enkephalinergetic neurons in the hypothalamic magnocellular preoptic nucleus of the goldfish Carassius auratus. Cell. Tiss. Res. 200:143-151.
138. Reid J. and Rubin P. (1987). Peptides and central neural regulation of the circulation. Physiol. Rev. 67:725-749.
139. Reinier A., Davis B., Brecha N. and Karten H. (1984). The distribution of enkephalin immunoreactivity in the telencephalon of adult and developing domestic chicken. J. Comp. Neurol. 228:245-262.
140. Remy C. (1982). Parentes immunochimiques entre produits de neurosécrétion d' invertébrés et neuropeptides de vertébrés. J. Physiol. Paris 78:514-522.

141. Remy C. and Dubois M. (1981). Immunohistological evidence of methionine enkephalin-like material in the brain of the migratory locust. *Cell. Tissue Res.* 218:271-278.
142. Reynolds W. (1968). The effects of thyroxine upon the initial formation of the lateral motor column and differentiation of motor neurons in Rana pipiens. *J. Exp. Zool.* 153:237-248.
143. Romer S. y Parssons S. (1982). *Anatomia Comparada*. 5a edición. Nueva Editorial Interamericana. Cap. 16, pp:329-361.
144. Rosenkilde P. (1979). The Thyroid hormones in amphibian. In: *Hormones and Evolution*. Vol. 1 (E.J- W. Borrrington ed.). Acad. Press. New York. pp 437-491.
145. Rzsasa P., Kaloustion K. and Prokop E. (1984). Immunochemical evidence for Met-enkephalin-like and Leu-enkephalin-like peptides in tissue of earthworm. Lumbricus terrestris. *Com. Biochem. Physiol.* 77:345-350.
146. Satake N. (1979). Effect of melatonin and methionine-enkephalin od surfacing responses in Goldfish. *Physiol. Behav.* 23:995-999.
147. Sawin C., Bolaffi L., Vallard I., Bacharach P. and Jackson I. (1978). Induced metamorphosis in Ambystoma mexicanum: Lack of effect of triiodotyronine on tissue or blood levels of thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Gen. Comp. Endocrinol.* 36:427-432.
148. Schick S. and Schusdziarra V. (1985). Physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of exogenous and endogenous opiates. *Clin. Physiol. and Biochem.* 3:43-60.
149. SchreckenberG G. and Jacobson A. (1975). Normal stages of development of the axolotl, Ambystoma mexicanum. *Dev. Biol.* 42:391-400.
150. Schultheiss H. (1980). Isolation of pituitary proteins from mexican axolotls (Ambystoma mexicanum cope) by polyacrilamide gel electrophoresis. A assay for thyrotropic activity. *J. Exp. Zool.* 213:351-354.
151. Schultheiss H. (1980). T3 and T4 concentrations during metamorphosis of Xenopus laevis and Rana esculenta and in the neotenic Mexican axolotl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 40:372.
152. Sei C., Richard R. and Dores R. (1989). Steady-state levels of pro-dynorphin-related end-products from the brain of the amphibian. Xenopus laevis. *Brain Res.* 479:162-166.

153. Shaar J., Frederickson A., Dinninger B. and Jackson L. (1977). Enkephalin analogues and naloxone modulate the release of growth hormone and prolactin-evidence for regulation by an endogenous opioid peptides in brain. *Life Sci.* 21:853-860.
154. Shaffer H. (1989). Natural History ecology and evolution of mexican "axolotls". *Axolotl News Letter* 18:5-11. Indiana Univ. Axolotl. Colony.
155. Simon E., Hiller J. and Edelman. (1973). Stereospecific binding of potent narcotic analgesic H-etorphine to rat brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:1947-1949.
156. Simon J., Szucs M., Benyh S., Barsodi A., Zeman P. and Wolleman M. (1984). Solubilization and characterization of opioid binding sites from frog (*Rana esculenta*) brain. *J. Neurochem.* 43(4):957-963.
157. Smith H. (1989). Discovery of the axolotl and its early history in biological research. In: *Developmental biology of axolotl.* (Armstrong J. and Malacinski G. Eds.). Oxford University Press. New York.
158. Smith H. and Taylor H. (1948). An annotated checklist and key to amphibian of México. *Bull. USA National Museum.* 294.
159. Smith H. and Taylor H. (1950). Type localities of mexican reptiles and amphibians. *Univ. Kans. Dc. Bull.* 33: 313-318.
160. Smith T., Hughes J., Kosterlitz H. and Sosa R. (1976). Enkephalins isolation, distribution and function. In: H. W. Kosterlitz (ed). *Opiates and endogenous opioid peptides.* Elsevier/North.Halland Biomedical Press. Amsterdam. pp:57-62.
161. Sprules W. (1974). The adaptative significance of paedogenesis in North American species of Ambystoma (Amphibia:Caudata) an hipotesis. *Can. J. Zool.* 52:393-400.
162. Stefano G., Hall B., Makman M. and Dvorkin B. (1981). Opioid inhibition of dopamine release from nervous tissue of Mytilus edulis and Octopus bimaculatus. *Science* 213:928-930.
163. Stevens C. (1988). Opioid antinocoeption in amphibians. *Brain Res. Bull.* 21:959-962.
164. Stirling R. and Brandle K. (1982). Expansion of the visual projection to the tectum of axolotls during metamorphosis. *Dev. Brain. Res.* 5:343-345.
165. Stubbs W., Jones A., Edwards C., Delitala G. Jeffcoate W. Ratter S., Besse G., Bloom S. and Alberti K. (1978). Hormonal and metabolic responses to an enkephalin analogue in normal man. *Lancet*, ii 1225-1227.

166. Su Y., Wat C. and Lam D. (1985). Opioid pathways in avian retina. I. Biosynthesis and release of enkephalin in the chicken retina. *J. Neurosci.* 5:851-856.
167. Summy-Long J., Miller S., Rosell-Dampman M., Hartman D. and Emmet E. (1984). A functional role for opioid peptides in the differential secretion of vasopressin and oxytocin. *Brain Res.* 309:362-366.
168. Tata J. (1965). Turnover of nuclear and cytoplasmic RNA on the onset of induced amphibian metamorphosis. *Nature* 207:378-381.
169. Tata J., Kawahara A. and Baker B. (1991). Prolactin inhibits both thyroid hormone-induced morphogenesis and cell death in cultured amphibian larval tissues. *Dev. Biol.* 146:72-80.
170. Taurong A., Oliver C., Eskay R., Porter J. and McKenzie J. (1974). The role of TRH in the neoteny of the mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Gen. Com. Endocrinol.* 24:267-279.
171. Taylor A. and Kollros J. (1946). Stages in normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat Rec.* 94:7-23.
172. Tompkins R. and Townsan J. (1982). Control of metamorphosis events in a neotenic urodele *Ambystoma mexicanum*. Rapid communication. *J. Exp. Zool.* 200:191-196.
173. Udenfriend S. and Kilpatrick D. (1983). Biochemistry of the enkephalins and enkephalin-containing peptides. *Arch. Biochem. Biophys.* 221:309-323.
174. Van Vugt D. and Meites J. (1980). Influence of endogenous opiates on anterior pituitary function. *Fed. Proc.* 39:2533-2538.
175. Vanddorpe G., Jacobs G. and Kuhn E. (1987). Seasonal changes of the 5'-monodeiodination activity in kidney and skin homogenates of male *Rana ridibunda*: relation to plasma thyroxine (T₄) and testosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68:163-169.
176. Venturini G., Caegli A., Palladini G., Margotta V. and Lauro M.G. (1983). Radioimmunological and immunocyto-chemical demonstration of met-enkephalin in planaria. *Comp. Biochem. Physiol.* 74C:35-25.
177. Vindrola O., Briones R., Asai M. and Fernández-Guardiola A. (1981). Amygdaloid kidling enhances the enkephalin content in rat brain. *Neurosci. Lett.* 21:39-43.

178. Watt C. Li W. Fray K. and Lam D. (1985). Localization of enkephalin-like immunoreactive amacrine cells in the larval Tiger salamander retina: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 241:171-179.
179. Wehe E., Macnigh A., Corberth A. and Kosterlitz H. (1985). Proenkephalin- and prodynorphin derived opioid peptides inguinea ping heart. *Neuropeptides* 5:453-456.
180. Weichert C y Presch W. (1981). Elementos de anatomia de los cordados. 4a. edicion. McGraw-Hill, Mexico D.F. 531 pags.
181. Wells E. and Moser R. (1982). Influence of vasopressin and oxitocin on neoteny in the adult mexican axolotl Ambystoma mexicanum. *J. Exp. Zool.* 221:173-178.
182. Weisz P. (1985). La ciencia de la Zoologia: 5a. edicion. Ediciones Omega. Barcelona España.
183. White J., Stewart K., Krause J. and Mckelvy J. (1985). Biochemistry of peptide-secreting neurons. *Am. Physiol. Soc.* (65). 3:553-606.
184. Wolters J., Donkelaar H. and Verhofstend A. (1986). distribution of some peptides (substance P, leu-enkephalin, met-enkephalin) in the brain stem and spinal cord of a lizard, Veranus exanthematicus. *Neuroscience* 18:917-946.
185. Wood S. (1971). Effects of metamorphosis on bloom respiratory properties and erythrocyte ATP levels in the salamander. Dicamptodon ensatus. *Respiration Pysiol.* 12:53-65.
186. Wood J. (1982). Neuroendocrinology of cerebrospinal fluid: Peptides, steroids and other hormones. *Neurosurgery* 11:293-305.
187. Zamir N., Palkovits M., Weber E., Mesey E. and Brownstein M. (1984). A dynorphinergic pathway of leu-enkephalin production in rat substantia nigra. *Nature* 307:643-645.
188. Zipser B. (1980). Identification of specific leech neurones immunoreactive to enkephalin. *Nature* 283:857-858.