

167
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO DE LA DISTRIBUCION ANATOMICA DE LOS
PEPTIDOS OPIOIDES EN EL CEREBRO DEL AXOLOTL, *Ambystoma mexicanum*.

Tesis que para obtener el título de biólogo presenta:

EDUARDO SANCHEZ ISLAS.

Director de la Tesis: M en C Martha León-Olea.

Asesor interno: Dra. Hortensia González Gómez.

Realizada en:

INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRIA.
División de Investigaciones en Neurociencias,
Laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica.

MEXICO 1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Pag.
Resumen.....	1
Capítulo I. LOS PEPTIDOS OPIOIDES	
I.1 Generalidades.....	2
I.2 Biosíntesis.....	4
Figura 1.....	6
I.3 Precusores.....	7
Figura 2.....	8
Tabla I.....	9
I.4 Liberación.....	10
I.5 Receptores.....	10
Tabla II.....	11
I.6 Distribución.....	12
Figura 3.....	14
Figura 4.....	15
Tabla III.....	16
I.7 Fisiología.....	17
Capítulo II. LOS PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA	
II.1 Generalidades.....	18
Tabla IVa.....	20
Tabla IVb.....	21
II.2 Péptidos Opioides en Anfibios.....	22
Capítulo III. CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS GENERALES Y NEUROANATOMICAS DEL AXOLOTL	
III.1 Clasificación Taxonómica.....	26
Figura 5.....	27
III.2 El Sistema Nervioso Central del <i>Ambystoma</i>	28
Figura 6.....	29
III.4 Objetivos.....	40
Capítulo IV. MATERIAL Y METODO	
IV.1 Estudios Histológicos.....	41
IV.2 Estudio Inmunohistoquímico.....	42
Figura 7.....	45

IV. 3 Especificaciones de los antisueros.....	46
---	----

Capitulo V RESULTADOS

V.1 Resultados de los Estudios Histológicos.....	48
--	----

V.2 Resultado de los Estudios Inmunoquímicos.....	48
---	----

Tabla V.....	49
--------------	----

V.2.1 Distribución Regional de la IR a Leu- y Met- encefalinas en el Cerebro del Axolotl.....	49
---	----

Figura 8.....	52
---------------	----

Figura 9.....	55
---------------	----

Figura 10.....	57
----------------	----

Figura 11.....	59
----------------	----

Tabla VI.....	60
---------------	----

Figura 12.....	61
----------------	----

Figura 13.....	63
----------------	----

Figura 14.....	65
----------------	----

Capitulo VI

VI.1 Discusión.....	66
---------------------	----

VI.2 Conclusiones.....	72
------------------------	----

VI.3 Anexos.....	73
------------------	----

VI.4 Bibliografía.....	76
------------------------	----

RESUMEN

Las encefalinas son oligopeptidos con acción opioide. Tienen una amplia distribución filogenética, desde organismos unicelulares hasta el hombre, además de conservar su estructura molecular y una coherencia evolutiva en sus funciones. En el sistema nervioso central, las encefalinas funcionan como neurotransmisores, neuromoduladores y neurohormonas. En anfibios se ha determinado con diversas técnicas la existencia y la localización de estas sustancias endógenas. Sin embargo, es de interés conocer la distribución de estos péptidos en el SNC del Ambystoma mexicanum por tener características biológicas particulares como la neotenia. Con base en estos estudios se podría analizar el papel fisiológico que juegan las encefalinas en dicho anfibio.

En el presente estudio se determinó la distribución de las fibras y neuronas inmunorreactivas (FIR, NIR) a Leu- y Met-encefalinas (LE, ME), en el cerebro del Ambystoma mexicanum. Se utilizaron 15 ajolotes, mantenidos a una temperatura de 18-20 °C, con un ciclo luz/obscuridad 10/14 h. Cuatro de ellos fueron pretratados con colchicina (15µg /20µl, en sol. salina, i.m.), durante 3 días. Se anestesiaron con benzocaína y se perfundieron con paraformaldehído (4%). El cerebro se cortó en secciones coronales, transversales y parasagitales (10-15 µm). Se realizó la técnica indirecta de inmunofluorescencia, con antisueros específicos para LE y ME, y sus controles respectivos. Nuestros resultados muestran una gran densidad de FIR a LE y ME en la región ventral y ventro lateral del telencéfalo. Se encontraron NIR aisladas en la pared medial telencefálica (núcleos septales) y lateral (palo hipocámpal). En el diencefalo hay un número mayor de NIR y FIR para LE y ME, distribuidas en los núcleos habenuares, en los núcleos ventrales del tálamo y en los núcleos hipotálamicos, así como una gran densidad de FIR en las paredes laterales diencefálicas. En el mesencéfalo encontramos NIR aisladas en tectum y tegmentum para LE y ME, y una escasa densidad de FIR. En el rombencéfalo las FIR se distribuyen ventralmente dentro de la formación reticular con una densidad alta. Se encontraron grupos de NIR (3-5 por campo) cercanas al núcleo motor del V par.

Los resultados muestran que la distribución anatómica de NIR y FIR a LE y ME es similar a la encontrada en otros vertebrados. El A. mexicanum presenta una amplia distribución de las encefalinas sin una localización anatómica diferencial específica entre la inmunoreactividad a LE y ME. La distribución de estos péptidos opioides en las diferentes regiones cerebrales del A. mexicanum, sugiere la posibilidad de la modulación de la información somatosensorial e inclusive motora ejercida por estos péptidos, como ocurre en los vertebrados superiores. El A. mexicanum por ser un anfibio neoténico, se propone como un modelo idoneo para el estudio de la ontogenia de los péptidos opioides.

Capítulo I

LOS PEPTIDOS OPIOIDES

I.1 Generalidades

La palabra opio proviene del griego, y significa jugo o exudado lechoso, el cual es extraído de la adormidera Somniferum papaverin.

El opio y sus alcaloides se han utilizado en medicina, por sus efectos analgésicos. Se sabe que desde el siglo III A.C. esta droga ya proporcionaba al hombre sus potentes acciones narcóticas, analgésicas y euforizantes.

En 1806, Friedrich Serturmer aisló un alcaloide del opio al que le llamó morphium (por Morfeo dios del sueño entre los griegos). En 1832, el químico francés Pierre-Jean Robiquet aisló la codeína que es un alcaloide del grupo de los fenantrenos que tiene efectos similares a la morfina. En 1848, se aisló la papaverina y a mediados del siglo XIX se empezaron a utilizar en medicina los alcaloides puros (Peset, 1973).

Las investigaciones que se hicieron sobre el modo de acción de los péptidos opioides se pudieron realizar hasta que se utilizó el ileon aislado del cobayo, en donde se pudo observar que la peristalsis provocada por incremento en la presión intraluminal podía ser inhibida por concentraciones de morfina equivalente a una dosis terapéutica. Posteriormente, al observar que solamente la forma levógira de la mezcla racémica de alcaloides opiáceos provocaban los efectos analgésicos; se pensó que podrían existir sitios de unión estereoespecíficos para los opiáceos (Goldstein y col., 1971). Fue hasta la década de los años setenta cuando se aportaron evidencias claras del modo de acción de los opioides debido a la identificación

de los receptores estereoespecíficos a la morfina por medio de ligandos sintéticos específicos como la naloxona tritiada. Estos trabajos fueron realizados simultáneamente por Terenius en Suiza y Snyder en Baltimore (1973).

Algunas observaciones hicieron pensar que había sustancias endógenas que mimetizaban a los derivados del opio, como son: a) el descubrimiento de los receptores a opiáceos en el íleo de cobayo y en el conducto deferente del ratón, b) la existencia de receptores a opiáceos en las membranas de células nerviosas en donde tienen efecto los opiáceos, c) que los efectos de la morfina eran revertidos por la naloxona, d) que la estimulación eléctrica, mediante técnicas electrofisiológicas, de la sustancia gris periacueductal del cerebro de la rata produjera analgesia. (Pert y Snyder, 1973; Terenius L., 1973; Akil y col., 1976; Mayer y Liebeskind, 1974).

Martin, en 1976, propuso la existencia de estos compuestos, y fue hasta 1975 en que Hughes, en experimentos realizados con homogenados de cerebro de cerdo logró purificar una sustancia que reproducía los efectos de la morfina en las preparaciones biológicas del conducto deferente del ratón y del íleo del cobayo, con la inhibición de las contracciones evocadas. Este efecto era revertido por antagonistas de la morfina como la naloxona.

En 1975 Hughes y col., dieron la secuencia de aminoácidos que conforman el oligopéptido que llamaron encefalina y que consiste en dos pentapéptidos correspondientes a la Metionina-encefalina (ME) y a la Leucina-encefalina (LE), cuya secuencia es:

NH₂-Tir-Gli-Gli-Fen-Met-COOH para la ME

NH₂-Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-COOH para la LE

Goldstein y col. (1971) aislaron un péptido de la hipófisis

del bovino y del cerdo que tenía los efectos de la morfina. En 1976 se identificó la estructura de este compuesto que fue llamado Beta-endorfina (BE), y corresponde al fragmento 61-91 de la B-Lipotrofina (BLPH) (Bradbury y col., 1976).

Guillemin y col. (1976) determinaron la estructura de la alfa y gama endorfina, aisladas del extracto de hipotálamo e hipófisis.

Estos hallazgos han sido corroborados por otros autores en varias especies de vertebrados y hasta el momento se conocen alrededor de 40 péptidos endógenos que se unen a los mismos receptores que el opio, que son agonistas de la morfina y que se sintetizan endógenamente. A éstos se les conoce con el nombre de péptidos opioides, a diferencia de las sustancias derivadas del opio y sus derivados sintéticos a los que se les llama opiáceos. Los péptidos opioides provienen de tres moléculas precursoras que son: la proencefalina A, la proencefalina B y la proopiomelanocortina de las cuales se hablara mas adelante.

I.2 Biosíntesis

Se ha establecido que los péptidos opioides biológicamente activos son sintetizados a partir de grandes moléculas precursoras, que se procesan durante su transporte intracelular para dar lugar a la molécula activa, como es el caso de las proteínas de exportación y los neuropeptidos (Steiner y col., 1980 y 1984). Este proceso biosintético incluye la transcripción, traducción en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER), transferencia de la prohormona del RER al aparato de Golgi de donde sale y se almacena en los gránulos secretorios previo a su liberación por exocitosis. El procesamiento postraduccional de la promolécula ocurre durante la migración desde el

RER hacia el exterior de la célula, con pasos individuales de maduración (hidrólisis, sulfatación, glicosilación, amidación, etc.), localizados dentro de compartimientos intracelulares que contienen los sistemas enzimáticos apropiados. Estos eventos originan a los productos bioactivos y determinan el tipo de péptido que se va a producir, dando como consecuencia su potencia, selectividad por el receptor, y función (fig. 1).

En el caso de las prohormonas y otras proteínas precursoras como la progastrina, prosomatostatina, proglucagon, provasopresina, etc., los sitios de rompimiento más frecuentes son en los pares de aminoácidos básicos (Arg-Arg, Arg-Lis, Lis-Lis). Estos limitan a ambos lados a los péptidos biológicamente activos en la secuencia de la molécula precursora, sugiriendo así la participación de enzimas del tipo de la tripsina y de la carboxipeptidasa. Sin embargo, se ha observado que en algunos precursores estos rompimientos proteolíticos no siempre se dan a nivel de pares de aminoácidos básicos, ni en todos los sitios en donde existen aminoácidos básicos hay rupturas. En el caso de la proopiomelanocortina (POMC) se ha encontrado que la enzima o enzimas involucradas en su procesamiento están en los gránulos de secreción y presentan propiedades acil-tiol-arginil proteasa (Chang y col., 1982). También se identificó una enzima del tipo de la catepsina D que rompe selectivamente a la BE hacia Gama-endorfina (Graf y col., 1979).

La ruptura de la proencefalina a nivel de aminoácidos básicos se atribuye a una enzima de la familia de la kaliceína (Dores y col., 1984). La remoción de los aminoácidos básicos en la región carboxilo terminal de los péptidos separados por la endopeptidasa se adjudica a una carboxipeptidasa dependiente de cobalto (Fricker y Snyder, 1983).

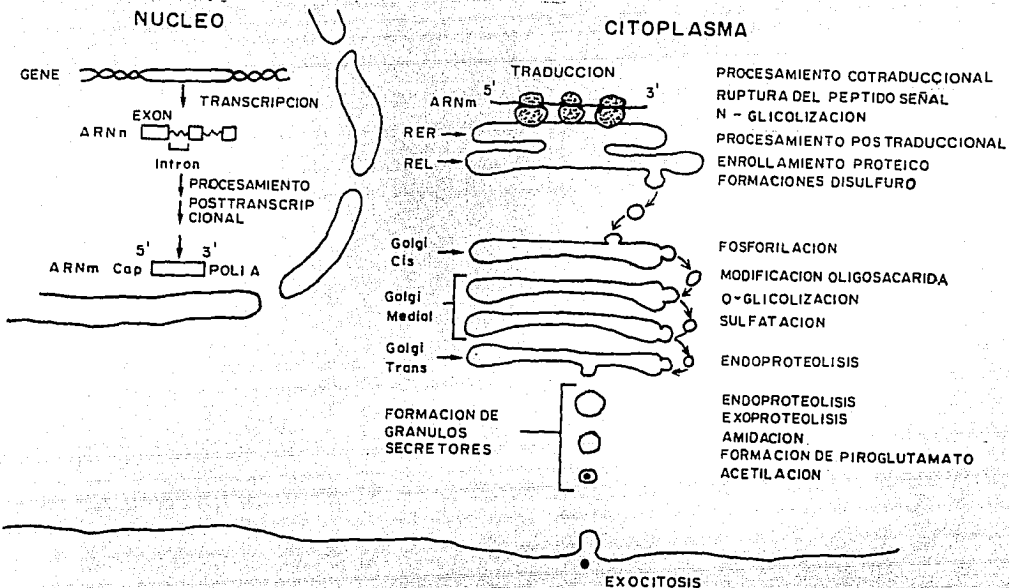


Figura 1. Representación esquemática de algunos eventos celulares y etapas del procesamiento en la biosíntesis de los péptidos (Tomado de Dorés M y col., 1991).

Los péptidos derivados de la prodinorfina se generan por rompimientos a nivel de pares de aminoácidos básicos, por lo que se propone la participación de enzimas semejantes a las propuestas para la proencefalina (Fischli y col., 1982; Goldstein y col., 1971); la rimorfina (Kilpatrick y col., 1982) y la dinorfina 1-8 (Mizuno y col., 1980) se liberan por rompimiento en un solo residuo de Arg. En ambos casos se sugiere la participación de una enzima del tipo de la tripsina.

I.3 Precursores

Desde 1982, gracias a la técnicas de DNA recombinante y a la química de proteínas sabemos que todos los péptidos opioides provienen de tres proteínas precursoras inactivas que son: la Proopiomelanocortina (Nakanishi y col., 1979) la Proencefalina A (PEF) (Comb y col., 1982; Gluber y col., 1982; Noda y col., 1982), y la Prodinorfina o Proencefalina B (PDFN); (Kakidani y col., 1982). Estas tres proteínas con sus péptidos derivados (Fig. 2 y tabla I) representan a los tres sistemas de péptidos opioides conocidos y se distribuyen de manera diferente en el SNC (fig. 3).

Según su estructura, y como se observa en la fig. 2, las tres moléculas precursoras de péptidos opioides tienen varias características en común: a) peso molecular muy parecido, cercano a 30 000 daltons, b) número de aminoácidos similar, entre 209 y 267, c) las secuencias correspondientes a los péptidos biológicamente activos dentro de la secuencia del precursor están limitadas en ambos extremos dados por pares de aminoácidos básicos, y d) la región amino terminal es rica en residuos de cisteína, no incluye aminoácidos de reconocimiento proteolítico típico y está precedida por una secuencia señal de naturaleza hidrofóbica. Estas similitudes sugieren una relación evolutiva entre las tres diferentes proteínas precursoras. Dichas proteínas representan una familia de genes y productos de genes relacionados funcionalmente. La significación biológica de los precursores de multihormonas puede ser la producción simultánea de péptidos activos, los cuales pueden actuar de una manera coordinada en respuesta a alguna perturbación fisiológica. Es interesante señalar que la prodinorfina o proencefalina B contiene tres secuencias de la LE y carece de la secuencia de la ME.

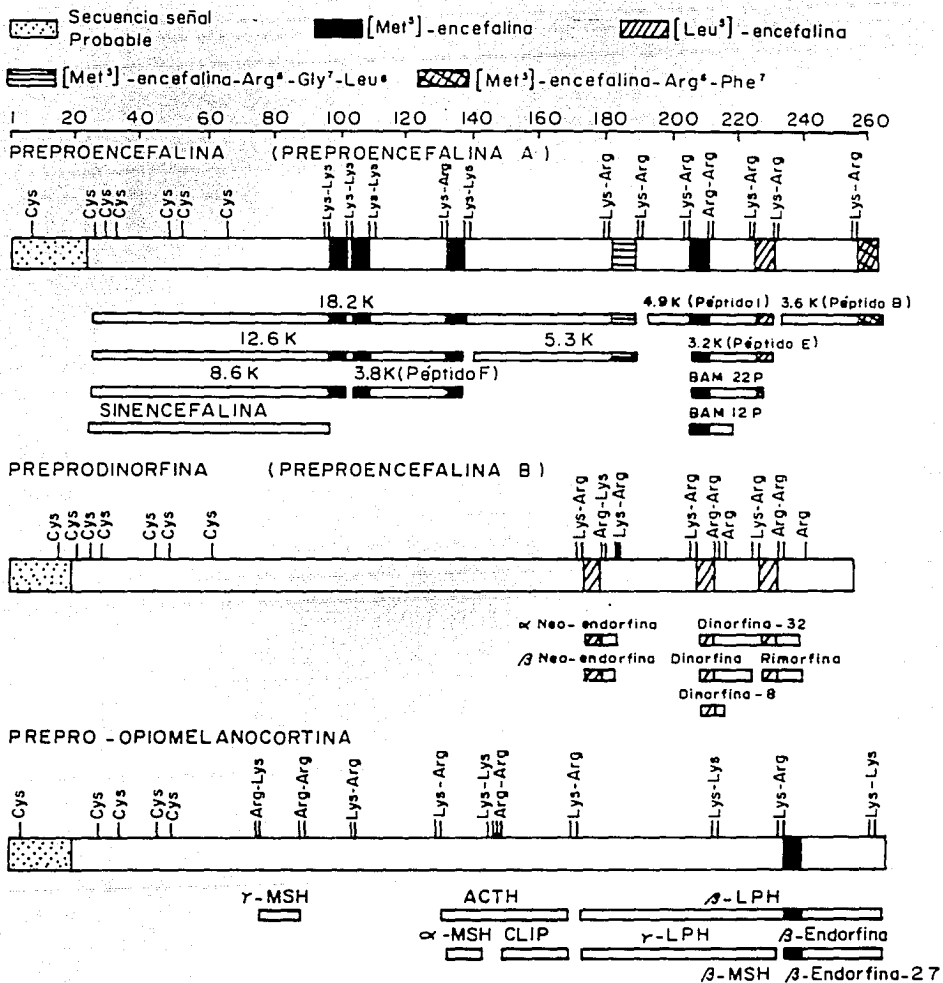


Figura 2. Representación esquemática del proceso proteolítico de las tres prohormonas que contienen péptidos opioides. Están señalados los aminoácidos básicos ya sean sencillos o en pares. Se han ilustrado únicamente los péptidos que han sido aislados y caracterizados por métodos bioquímicos en mamíferos. Esta figura es una modificación de Nakanishi y col., 1979; Udenfriend y Kilpatrick, 1983.

Tabla I.

FAMILIA DE PEPTIDOS OPIOIDES

β -Endorfina (CACTH) (porcina)	Proencefalina (Chumana)	Prodinorfina (porcina)
β -Endorfina	Met-Encefalina	Alfa-Neo-Endorfina
Tir-Gli-Gli-Fen-Met- Tir-Ser-Glu-Lis-Ser- Gln-Thr-Pro-Leu- Val-Tre-Leu-Fen-Lis- Asn-Ala-Ile-Val-Lis- Asn-Ala-His-Lis- Lis-Gli-Gln	Tir-Gli-Gli-Fen-Met	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu- Arg-Lis-Tir-Pro-Lis
	Leu-Encefalina	Beta-Neo-Endorfina
	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu- Arg-Lis-Tir-Pro
	Met-Encefalina-8	Dinorfina A-(1-8)
	Tir-Gli-Gli-Fen-Met- Arg-Gli-Leu	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu- Arg-Arg-Ile
	Met-Encefalina-Arg-Phe	Dinorfina A-(1-7)
	Tir-Gli-Gli-Fen-Met- Arg-Fen	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu- Arg-Arg-Ile-Arg-Pro- Lis-Leu-Trp-Asp- Asn-Gln
	Péptido E	Dinorfina B-(1-13)
	Tir-Gli-Gli-Fen-Met- Arg-Arg-Val-Gli-Arg- Pro-Glu-Trp-Trp-Met- Asp-Tir-Gln-Lis-Arg- Tir-Gli-Gli-Fen-Leu	Tir-Gli-Gli-Fen-Leu- Arg-Arg-Gln-Fen-Lis- Val-Val-Tre

Principales péptidos opioides que han sido extraídos y secuenciados del tejido nervioso. Como se puede ver en esta tabla, cada uno de los péptidos opioides deriva de una, o de más moléculas precursoras conocidas, la proopiomelanocortina (POMC) de donde proviene la β -Endorfina, la proencefalina A, precursor de las encefalinas y la proencefalina B o prodinorfina, precursor de las dinorfinas. Modificado de Akil y col., 1984.

I.4 Liberación

La liberación de estos péptidos ha sido estudiada en experimentos en rebanadas de diferentes regiones cerebrales o el tejido integro de diferentes especies animales (Iversen y col., 1978; Bayon y col., 1978; Osborne y col., 1978, Pellicer y col., 1993, entre otros). Todos estos trabajos han mostrado que la liberación inducida por potasio es un proceso dependiente de calcio por lo que se presume que estos neuropéptidos se comportan como otros neurotransmisores del Sistema Nervioso Central (SNC).

I.5 Receptores

El descubrimiento de los receptores estereoespecíficos a la morfina precedió al aislamiento y caracterización de las endorfinas, que son sus ligandos endógenos.

Muchos de los estudios recientes sobre los receptores a los péptidos opioides han tratado de definir y caracterizar los diferentes tipos de receptores. La existencia de clases separadas de receptores fue propuesta primero por Martin y col. (1976), con base en las diferentes respuestas fisiológicas obtenidas al probar diversos tipos de opiáceos mediante la preparación de perro espinal crónico. Ellos propusieron tres tipos de receptores: μ para los compuestos como la morfina, κ para las drogas como la cetociclazocina y σ para las drogas como la N-alilmetazocina. Además de estos tipos de receptores Kosterlitz (1979) aportó evidencias sobre un cuarto tipo de receptor al que denominó δ .

Los resultados de los experimentos farmacológicos fueron

corroborados en ensayos de unión a receptor y los estudios de autorradiografía demostraron que los receptores μ , δ y κ son distintos sitios de unión, que se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC de diferentes especies animales. (Chang y col., 1979a y 1979b; Part y col., 1975; Bonnet y col., 1981; Lewis y col., 1982; Ninkovic y col., 1981). Estos estudios y los de desplazamiento competitivo son de gran importancia para establecer la especificidad funcional de cada tipo de receptor. Gracias a ellos, se han podido desarrollar drogas selectivas para cada uno de ellos por ejemplo: drogas que causen analgesia, pero no depresión respiratoria. Una de las clasificaciones propuestas se presentó en la tabla II.

TABLA II.

TIPOS DE RECEPTORES PROPUESTOS

Tipo de receptor	Agonistas farmacológicos	Peptido Agonista	Tejido probado
Mu	Morfina, dihidromorfina, fentanil	β -Endorfina, Met-Enc.	Ileo de cobayo
Delta	Leu-Enc., DADLE, DSLET	Enkefalinas	Conducto deferente de ratón
Kapa	Cetociclotocina, etilketozocina	Dinorfina	Conducto deferente de conejo, ileo de cobayo.
Sigma	n-Alilmetazocina, Peniciclidina	?	-----
Epsilon	-----	β -Endorfina	-----

DADLE (D-Ala²-D-Leu⁵-Enc), DSLET (D-Ser²-Leu⁵-Enc-Tyr⁶). Modificada de Holaday y col., 1989.

Se ha visto que hay una correlación alta entre la densidad de los receptores opioides, en diferentes regiones del cerebro y la médula espinal de mamíferos, y la densidad de péptidos opioides contenidos en somas y fibras neuronales en las mismas regiones. Sin embargo, hay regiones en donde la correlación entre ellos es

aparentemente baja. Para hacer clara esta diferencia se requiere de anticuerpos específicos para péptidos opioides y sus precursores así como de autorradiografía de alta resolución para poner en evidencia las diferentes clases de receptores, y la distribución de las enzimas responsables de la degradación de estos péptidos (fig. 3 y 4).

En la tabla III, se presenta una comparación de las densidades relativas de POMC, pro-encefalina y prodinorfina en varias regiones del SNC. Esta tabla indica cualitativamente los lugares donde hay una buena interacción péptido-receptor, así como de los sitios donde esta interacción no se observa (Modificada de Mansour y col., 1988).

I.6 Distribucion

Los péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC) se han encontrado en concentraciones altas en la glándula hipófisis (Bloom y col., 1977; Mendelsohn y col., 1979). En el cerebro, estos péptidos se producen en el núcleo basal medial hipotalámico en los somas neuronales y en sus proyecciones que están en muchas áreas del SNC incluyendo al sistema límbico y al tallo cerebral. El efecto postraduccional de los precursores es diferente para la hipófisis y para el cerebro; la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y la beta-lipotrofina (BLPH) son los productos principales en la hipófisis humana, en el cerebro es la alfa-melanocito estimulante y la beta-endorfina (BE) (Watson y Akil, 1980; Zakarian y Smyth, 1982). La POMC es la única de los tres precursores de los péptidos opioides que da origen a otros péptidos que no tienen propiedades opioides.

La proencefalina-A contiene 7 zonas en donde se encuentra la secuencia de las encefalinas; 6 son para ME y 1 para LE (Gubler y col., 1982; Comb y col., 1982). Este precursor se aisló primero de

médula adrenal (Yang y col., 1980) y posteriormente de otros tejidos como son SNC y tracto gastrointestinal. En el SNC los derivados de la proencefalina-A están más ampliamente distribuidos que la BE.

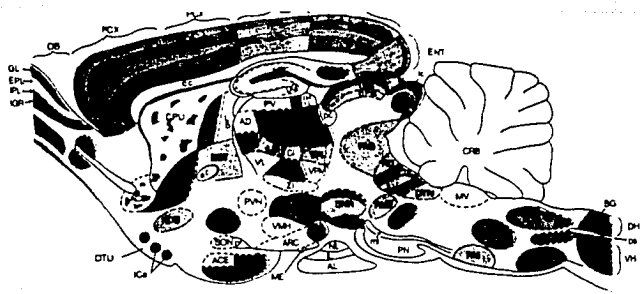
La prodinorfina contiene la secuencia de la Leu-E en la porción amino terminal (NH₂) (Kakidani y col., 1982). Existen evidencias de que en la porción nigro estriatal, la LE que contienen las neuronas de esta región proviene de la prodinorfina (Zamir y col., 1984). La inmunorreactividad a dinorfinas se ha encontrado especialmente en el área hipotalámica principalmente en las neuronas que contienen vasopresina en el núcleo magnocelular y que proyectan a la neurohipófisis (LN) (Watson y col., 1981; Weber y col., 1981). Estudios de inmunocitoquímica con microscopía electrónica demuestran que en estas neuronas del núcleo magnocelular las vesículas en donde está contenida la dinorfina 1-8 también tienen vasopresina y esta asociada a neurofisisina. La inmunorreactividad (IR) a dinorfinas se ha encontrado también en tallo cerebral, amígdala y tracto gastrointestinal.

Los estudios inmunohistoquímicos de distribución anatómica demuestran que los tres precursores de los péptidos opioides son expresados en distintas poblaciones neuronales en el cerebro (Khachaturian y col., 1985). La POMC se expresa en células diferentes a las que presentan IR a las encefalinas (Bloom y col., 1978; Rossier y col., 1977). La proencefalina A y la prodinorfina han sido mapeadas utilizando antisueros dirigidos contra secuencias específicas para cada precursor y se han encontrado algunas diferencias y similitudes en su localización (fig.4 y tabla III).

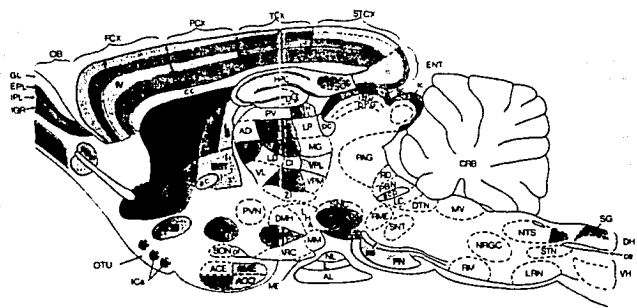
ABREVIACIONES

De las figuras 2 y 4

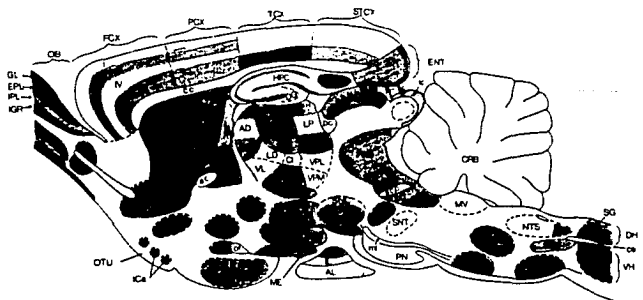
AA= Amígdala anterior, ABL= núcleo basolateral de la amígdala, AC= comisura anterior, ABC= núcleo acumbens, ACE= núcleo central de la amígdala, ACO= núcleo cortical de la amígdala, AD= núcleo anterior dorsal del tálamo, AL= lóbulo anterior de la pituitaria, AM= núcleo medial de la amígdala, AMB= núcleo ambiguo, AME= núcleo medial de la amígdala, AON= núcleo olfatorio anterior, ARC= núcleo arcuato, AV= núcleo anteroventral del tálamo, BST= núcleos basales de la estria terminalis, CC= cuerpo calloso, CGX= corteza del cíngulo, CL= tálamo centrolateral, CM= núcleo centro medial del tálamo, COCH= complejo nuclear coclear, CPU= caudo putamen, CST= tracto corticoespinal, DH= dorsal de la médula espinal, DG= giro dentado, DM= núcleo dorsomedial del hipotálamo, DNV= núcleo dorsal motor del vago, DNT= núcleo tegmental dorsal, ENT= corteza entorrinal, FM= núcleo fatigal del cerebelo, FCX= corteza frontal, GL= capa glomerular del bulbo olfatorio, GP= globo pálido, HM= núcleo habenuar medial, HPC= hipocampo, ICA= islotes de Calleja, IC= colículo inferior, IGR= capa granular intermedia, IL= lóbulo intermedio de la pituitaria, IMD= tálamo intermedio dorsal, IP= complejo nuclear interpedúncular, IPL= capa pléxiforme intermedia, LC= núcleo del locus coeruleus, LD= tálamo laterodorsal, LG= núcleo geniculado lateral, LHA= área hipotalámica lateral, LRN= núcleo reticular lateral, ME= eminencia media, MF= fibras musgosas del hipocampo, MFN= núcleos faciales motores, MG= núcleo geniculado medial, ML= lemnisco medio, MM= núcleos mamilares mediales, MNT= núcleos mesencefálicos del trigémino, MS= septum medial, MVN= núcleo vestibular medial, NCU= núcleo cuneatus, NCX= neocórtex, NDB= núcleo de la banda, NL= lóbulo neural de la pituitaria, NV= núcleo vestibular medial, NRG= núcleo reticular gigante celularis, NRP= núcleo reticularis paragigantocelularis, NTS= núcleo del tracto solitario, OCX= corteza occipital, OT= tracto óptico, OTU= tubérculo olfatorio, PAG= gris periacueductal, PAX= corteza periamigdalóide, PBN= núcleo parabraquial, PC= comisura posterior, PIR= núcleo parabraquial, PN= puente, POA= área preóptica, PP= ruta perforante, PV= núcleo periventricular del tálamo, PVN(CM)= núcleo PV partes magnocelularis, PVN(CP)= núcleo PV partes parvocelularis, RD= núcleo rafe dorsal, RE= núcleo reuniens del tálamo, RF= formación reticular, RM= núcleo magno del rafe, RME= núcleo mediano del rafe, SC= colículo superior, SCP= pedúnculo cerebelar, SG= substancia gelatinosa, SM= estria medularis del tálamo, SNC= substancia negra compactada, SNR= SN reticular, SNT= núcleo sensorial del trigémino (principal), SON= núcleo supraóptico, SPT= núcleo septal, STN= núcleo espinal del trigémino, SUB= subiculum, VL= tálamo ventrolateral, VM= núcleo ventromedial del hipotálamo, VP= pálido ventral, VPL= tálamo ventroposterolateral, ZI= zona incerta.



RECEPTORES MU



RECEPTORES DELTA



RECEPTORES KAPA

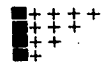
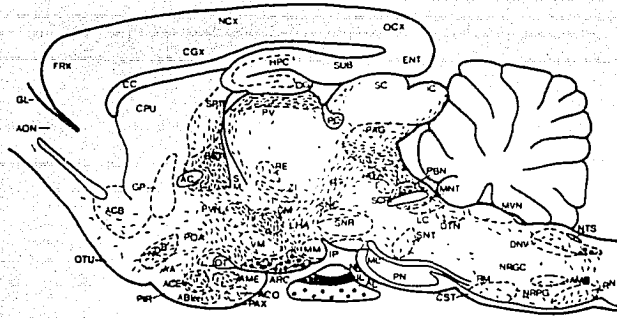
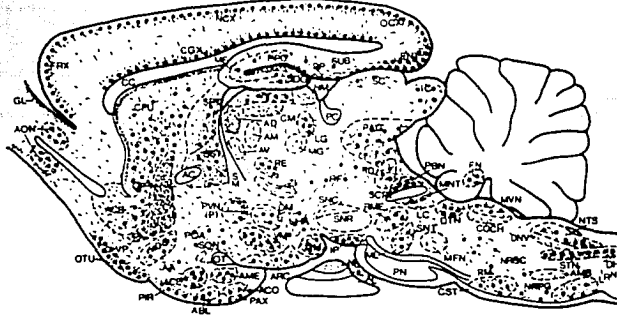


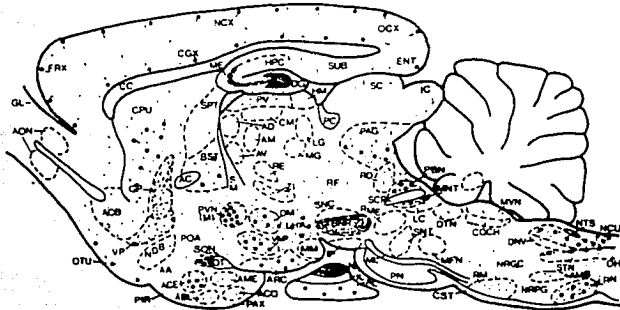
Figura 3. Representación esquemática de los receptores opioides mu, delta y kapa en el cerebro de la rata, determinado por técnicas de autorradiografía de receptor. Para facilitar la descripción de estas distribuciones, las diferentes densidades del receptor fueron coloreadas de acuerdo al siguiente código, con rojo= muy denso (++++), naranja= denso (+++), verde= moderado (++) y azul= ligero (+). Estos términos no son cuantitativos y sólo dan una medida relativa de la distribución de un receptor. Tomado de Mansour y col., 1988



PROOPIOMELANOCORTINA



PROENCEFALINA



PRODINORFINA

Figura 4. Representación esquemática de la distribución de los péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina, proencefalina y prodinorfinina en el sistema nervioso central de la rata, determinado por estudios inmunohistoquímicos. En estos tres mapas parasagitales, las neuronas son demostradas como círculos sólidos y las fibras y terminales como líneas curvas y puntos. Tomado de Khachaturian y col., 1985.

TABLA III

DISTRIBUCION DE RECEPTORES Y PEPTIDOS OPIOIDES EN EL CEREBRO DE LA RATA

Región del SNC	Receptores			POMC	Péptidos	
	mu	delta	kappa		Pro-enc	Pro-din
I. Telencéfalo						
Neocorteza						
Frontal	+++	++	+	0	++	+
Piriforme	++	++	++	0	++	+
Entorrinal	++	++	++	0	+++	+
Amígdala (núcleos)						
Central	0	0	++	++++	++++	++
Medial	+++	++	++	+++	+++	+
Lateral	++++	+++	+++	++	+++	+
Formación Hipocampal						
Hipocampo	+++	++	+	0	++	+++
Giro Dentado	+++	+	+	0	++	+++
Tubérculo Olfatorio	+	+++	+++	0	++	++
Núcleo Accumbens	++++	++++	+++	+	+++	++
Cuerpo Estriado	++++	++++	+++	0	+++	++
Globo Pálido	+	+	+	0	++++	+++
Septo Medial	+++	+	+	+++	+++	0
N.Bas. Estría Terminal	++	++	+++	++++	+++	++
Area Preóptica	+	+	++++	+++	+++	++
II. Diencéfalo						
Hipotálamo (núcleos)						
Supraóptico	0	0	++	0	+	+++
Paraventricular	0	0	++	++++	++++	++++
Arcuato	0	0	++	++++	+++	++
Ventromedial	0	+	+++	+	+++	++
Dorsomedial	+	0	+++	++++	++	++
Area Hipotalámica Lat.	+	0	++	+++	++	+++
Tálamo (núcleos)						
Periventricular	0	0	+++	++++	+++	+
Central-Medial	++++	+	++	0	+++	0
Reuniens	++++	+	++	0	++	0
Habénula Medial	+++	+	+++	0	+++	0
III. Mesencéfalo						
Núcleo Interpeduncular (central)						
Substancia Negra						
Parte Compacta	+++	0	0	+	++	+
Parte Reticulada	++	+	+	0	+	++++
Area Ventral Tegmental	++	0	+	++	++	+
Sub. Gris Periacueductal	+	0	++	++++	+++	++
Colículos Sup. e Inf.	++++	+	++	++	+++	+
Núcleo Rafé Dorsal	++	0	++	+++	++	+
IV. Puente/Médula (núcleos)						
Parabraquial	+++	0	++	+++	+++	++
Rafé Magno	++	0	+	+	+++	++
Reticular Gigantocel.	+	0	+	++	+++	+
Tracto Solitario (caudal)	++++	+	+++	+++	+++	+++
Reticular Lateral	+	0	+	+++	+++	+
Espinal del Trigémino	+++	0	++	++	++++	+++
V. Médula Espinal						
Substancia Gelatinosa	+++	+	++	++	++++	+++

++++=muy denso, +++=denso, ++=moderado, +=bajo, 0=no detectable
(Modificada de Mansour y col., 1988)

I.7 Fisiología

Actualmente se tienen evidencias de que los péptidos opioides actúan como sustancias neurotransmisoras o neuromoduladoras ya que cumplen con las siguientes características:

- a) Se sintetizan en las neuronas.
- b) Se encuentran en terminales sinápticas dentro de vesículas o gránulos de secreción.
- c) Se liberan por despolarización eléctrica y con altas concentraciones de potasio. Su liberación es calcio-dependiente y está asociada a gránulos de secreción.
- d) Al ser aplicados exógenamente producen efectos similares a los provocados por los péptidos opioides endógenos.
- e) Una vez que ejercen su acción se ha observado su inactivación por peptidasas que los hidrolizan (Kandel, 1991).

Estos criterios han sido propuestos para identificar cualquier sustancia que se considere como neurotransmisora.

Desde su descubrimiento las encefalinas y las endorfinas, que son péptidos endógenos con propiedades parecidas a la morfina, han sido examinadas por sus cualidades analgésicas. Sin embargo, gracias a las numerosas investigaciones realizadas desde la década pasada se ha establecido la participación de estos péptidos en muchas otras funciones, como en los procesos de modulación de la información sensorial, en la fisiopatología del estrés, en la regulación de los sistemas cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, renal y neuroendócrino, en la termorregulación, en la regulación de la ingesta de alimentos e hidratación, en la regulación de funciones como la conducta sexual, la locomoción, el crecimiento, memoria y aprendizaje, y su participación en desórdenes mentales y neurológicos como la esquizofrenia, y la epileptogénesis. De manera reciente se les ha relacionado también con el sistema inmunológico y el desarrollo del cáncer (revisión de Olson y col., 1990 y 1991).

Capítulo II

LOS PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA

II.1 Generalidades

Los péptidos opioides y sus receptores se han reportado no sólo en los mamíferos sino también en muchos otros organismos a lo largo de la escala filogenética, desde organismos unicelulares (Leroith y col., 1982), pasando por invertebrados, protocordados, y vertebrados hasta el hombre (Gustafsson y col., 1986; Leung y Stefano, 1984; Cone y Goldstein, 1982; Takahashi y col., 1984; Pestarino, 1985; Bayón y col., 1980a; Brauth, 1984; Petrusz y col., 1984, entre otros).

Los primeros estudios sugirieron que los péptidos opioides y sus receptores se encontraban únicamente en los mamíferos (Pert y col., 1974). Sin embargo, estudios posteriores hicieron evidente que estos péptidos tenían una amplia distribución filogenética. Se han identificado por medio de estudios inmunohistoquímicos y se han aislado y secuenciado en diferentes especies de invertebrados y vertebrados (Gustafsson y col., 1986; Leung y Stefano, 1984; Santoro y col., 1985; León-Olea y col., 1987).

Los resultados de investigaciones sobre el comportamiento, la fisiología y la farmacología en moluscos muestran que los péptidos opioides endógenos así como los antagonistas y agonistas exógenos semejan las acciones de los opioides encontrados en los mamíferos, (Josefsson y Johansson, 1979; Kavaliers y Hirst, 1986; Kavaliers y col., 1985).

Por los estudios de unión estereoespecífica de alta afinidad para ligandos opioides con propiedades similares a las del tejido

nervioso se ha encontrado que éstos están presentes en vertebrados inferiores, moluscos y otras especies de invertebrados (Stefano y col., 1980; Stefano y col., 1982). Estas observaciones implican que hubo un desarrollo evolutivo temprano y una continuidad filogenética de los péptidos opioides y sus receptores. Además por estudios recientes de Zipser y col. (1985) efectuados por cruzamiento molecular, sugieren que los receptores opiáceos han permanecido estables a través de la escala evolutiva (Tabla IVa y b).

ABREVIACIONES 2

De la Tabla IV a la Tabla VIII y a la IX.

Am	Amígdala	NHh	Neurohipofisis
AdHI	Adenohipofisis	NI	Núcleo interpeduncular
AP	Área prefrontal	NOA	Núcleo olfatorio anterior
BO	Bulbo olfatorio	NPA	Núcleo preoptico anterior
CA	Comisura anterior	NPB	Núcleo preoptico lateral
GALL	Corpus allatum	NPO	Núcleo preoptico
Cb	Cerebelo	NS	Núcleos septales
CB	Capa seis	NTS	Núcleo del tracto solitario
CC	Corpus cardiacum	NVS	Núcleo visceral sensorial
CEAm	Complejo estriocamigdalino	PdHT	Parte dorsal hipotalámica
CHb	Comisura habenuilar	PD	Parte dorsal
CHp	Comisura hipocámpal	PdT	Parte dorsal talámica
CoNE	Complejo neural	Ped	Pedunculo
COa	Comisura anterior	PVM	Puente medular
CPto	Comisura postóptica	PP	Palio piriforme
DI	Diencefalo	PHp	Palio hipocámpal
EM	Eminencia media	PvT	Parte ventral talámica
F	Fornix	PVHT	Núcleo paraventricular hipotalámico
FHp	Formación hipocámpal	ROp	Órgano óptico
FOI	Fascículo posterior	RM	Núcleo reticular medio
FR	Formación reticular	RO	Rombencefalo
FS	Fascículo solitario	RP	Faceo preóptico
GC	Ganglio ciliar	Tc	Tectum
GPa	Ganglio parietal	ID	Talamo dorsal
GPd	Ganglio pedal	TE	Telencefalo
GPL	Ganglio pleural	TqD	Tegmentum dorsal
GSb	Ganglio subesofágico	TqI	Tegmentum istmico
GSI	Glandulas salivales	TPo	Tracto preóptico
Hb	Habenua	TT	Tracto talámico
Hc	Hipocampo	Tv	Talamo ventral
HL	Núcleo habenuilar lateral	VL	Ventriculo lateral
Hm	Núcleo habenuilar medial	ZM	Zona motora
Ht	Hipotalamo	ZS	Zona sensorial
Hi	Hipofisis	IIIv	Tercer ventriculo
HiIm	Hipofisis, parte intermedia	IVv	Cuarto ventriculo
ICO	Núcleo intercolicular		
In	Infundibulo		
Is	Istmo		
LA	Lobulo anterior		
LI	Lobulo intermedio		
LNI	Lobulo neurointermedio		
LOp	Lobulo optico		
ME	Medula		
MO	Medula oblongada		
NAm	Núcleo amigdalino		
NAc	Núcleo acumbens		
NC	Núcleo caudado		
NFS	Núcleo del fascículo solitario		

TABLA IV a.

PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA

PHILUM	ENDORFINAS	ENCEFALINAS	DINORFINAS
ESTRUCTURAS			
CORDADOS			
Mamíferos			
Rata	TE, DI, Hi	TE, DI, ME, P/M	TE, DI, ME
Aves			
Pichón	TE	TE, DI	----
Pollo doméstico	TE	TE, DI, ME, RO	----
Reptiles.			
Tortuga			
<i>Pseudemys scripta</i>	HiIm	TE, DI, ME, RO, HiIm	Cerebro ⁺
Lagarto			
<i>Anolis carolinensis</i>	HiIm, DI, ME	TE, DI, ME, RO, HiIm	Cerebro ⁺
Caiman			
<i>Alligator mississippiensis</i>	HiIm	----	Cerebro ⁻
Anfibios			
Rana			
<i>Rana esculenta</i>	----	TE, DI, ME, RO, HiEM	Cerebro ⁻ Medula y NHi
Sapo			
<i>Bufo marinus</i>	HiIm	NHi, HiEM	----
Axolotl			
<i>Ambystoma mexicanum</i>	Hi(CLA, LI)	HiEM, TE, DI, ME, RO	Hi(CLA, LI)
Peces			
Trucha arcoiris			
<i>Salmo gairdneri</i>	DI, ME, Hi	----	----
Salmón			
<i>Oncorhynchus keta</i>	Hi	----	----
Pez pulmonado			
<i>Protopterus annectens</i>	TE	----	----
Pez gato			
<i>Ictalurus nebulosus</i>	----	Cb	----
Pez dorado			
<i>Carassius litua</i>	----	Cb	----
<i>C. auratus</i>	NPo, Ht	Ht, MeCNVS	----
Agnatos			
Lamprea			
<i>Petromyzon marinus</i>	----	AdHi	----

Citas: Mamíferos: 4,53; aves: 5,21,97,98; reptiles: 12,25,32,76,100; anfibios: 3,20,59,72,73,93,107; peces: 27,29,95,96,99,107,118; agnatos: 25,27,80.

TABLA IV b.

PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA

	ENDORFINAS	ENCEFALINAS	DINORFINAS
ESTRUCTURAS			
Artropodos			
Insectos			
<i>Locusta migratoria</i> R y F.	----	GSb	----
<i>Bombus morio</i> L.	----	GSb	----
<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	GSb	----	----
<i>Calliphora vomitoria</i>	Cerebro, CC	CC, CA11	----
<i>Leucophaea maderae</i>	----	CC, CA11	----
Crustaceos			
<i>Carcinus maenas</i>	----	Cerebro*	----
<i>Squilla mantis</i>	----	Cerebro*, ganglio dorsal	----
Moluscos			
<i>Helix aspersa</i>	GPd, GP1, GPa, GC	GPd, GP1, GPa, GC	----
<i>Mytilus edulis</i>	----	GPd	----
<i>Octopus vulgaris</i>	----	Cerebro*, LOp	----
		GSl	
<i>Loligo vulgaris</i>	----	Cerebro*, l6bulos	----
An6lidos			
Lombriz de tierra			
<i>Lombicus terrestris</i>	GC	GC	----
Platelmintos			
Planaria			
	----	Organismo com.*	----
Sanguijuela			
	----	Organismo com.*	----
Tunicados			
Ascidea			
<i>Ciona intestinalis</i>	CoNe	Organismo com.*	----
Porifera			
Esponja			
<i>Dysidea avara</i>	----	Organismo com.*	----
Anemona			
<i>Anemonia sulcata</i>	----	Organismo com.*	----
Cili6foros			
<i>Tetrahymena pyriformis</i>			
	organismo com.*	----	----

+ Se utilizo el cerebro y el organismo completo. En estos estudios se utilizaron t6cnicas de radioinmunoan6lisis, inmunocitoquimica e inmunofluorescencia. Citas: artropodos : 62 ; moluscos : 58, 61, 94, 105, 112; an6lidos : 104; platelmintos : 62; tunicados : 62, 94 ; porifera: 62, 94; cili6foros: 62.

II.2 Peptidos opioides en anfibios

Como se describió en el inciso anterior, los peptidos opioides y sus receptores se encuentran en los organismos en todos los niveles de la escala filogenética. Sin embargo, es hasta los anfibios en que existen evidencias de que las proteínas precursoras de los péptidos opioides son estructuralmente homólogas a las de los mamíferos (Martens y col., 1985).

Martens y Hebert (1984) examinaron por medio de técnicas de biología molecular en la rana Xenopus laevis el gene que codifica la proencefalina, encontrando que la secuencia de los principales exones de los genes de la proencefalina codifican 7 secuencias de ME, pero ninguna secuencia de LE. Las posiciones de la ME dentro de la secuencia de la proencefalina son las mismas que en la secuencia de la proencefalina de mamíferos, pero el lugar que le correspondería a la LE está ocupado por una copia de ME. Por lo tanto en la proencefalina del Xenopus laevis no está contenida la secuencia de la LE, lo cual sugiere que la LE presente en el cerebro del Xenopus puede provenir de la prodinorfina.

La presencia de la POMC y sus derivados se han encontrado en el lóbulo neurointermedio de la hipófisis de la rana Xenopus laevis y la Rana rudibunda (Vaudry y col., 1984). En 1986, Leboulenger y col. 1984 demostraron la presencia de encefalinas en los gránulos cromafines de la rana. Con la técnica de cromatografía de filtración en gel sobre extractos ácidos de cerebro de Bufo marinus se encontraron ME, LE, y heptapéptido libres. La presencia del heptapéptido es una evidencia de que existe la proencefalina en los anfibios. Cone y col. (1982) encontraron que la concentración de

dinorfina (1-13) en la pituitaria de B. marinus presenta una concentración alta en el lóbulo neurointermedio, mientras que en el cerebro y la médula espinal la concentración de dinorfina (1-13) representa el 1% de lo encontrado en el lóbulo neurointermedio. La dinorfina (1-13) está presente en la hipófisis, cerebro y médula espinal del sapo Bufo marinus (Kilpatrick y col., 1983).

Los receptores opiáceos también se han encontrado en el SNC de los anfibios (Buatti y Pastermak, 1981; Ruegg y col., 1981; Simon y col., 1984 y 1985), en donde se ha demostrado que existen sitios de unión tipo μ , δ , y κ . Deviche y Moore (1989) caracterizaron y describieron la distribución de estos tres tipos de receptores en la hipófisis y cerebro del anfibio urodelo Taricha granulosa encontrando muchas similitudes con los mamíferos y otros vertebrados.

La distribución de los péptidos opioides, principalmente las encefalinas, en el SNC de los anfibios se han demostrado con la utilización de diversas técnicas. Merchenthaler y col. (1987) por medio de inmunocitoquímica analizaron la distribución de diferentes péptidos derivados de la proencefalina en el hipotálamo y tectum óptico de diferentes especies de anfibios anuros: Xenopus laevis, Rana esculenta y Bufo marinus. En estas especies se encontraron neuronas y fibras inmunorreactivas (NIR y FIR) en las diferentes regiones del hipotálamo y tectum. Los péptidos probados presentaron una localización anatómica similar en las tres especies de anuros coincidiendo con la distribución que presentan los vertebrados superiores en las mismas estructuras cerebrales. Posteriormente Merchenthaler y col. (1989) describieron la distribución de los péptidos derivados de la proencefalina pero ahora en todo el cerebro de la Rana esculenta. Encontraron que la localización de NIR y FIR para proencefalina se distribuye en la mayoría de las subdivisiones

del cerebro excepto en el mesencéfalo. En el telencéfalo, las NIR se encontraron en el palio, en el núcleo septal medial, en la parte ventral y dorsal del estriado, y en la amígdala. En el diencefalo, las NIR se localizaron en el núcleo preóptico, en las partes dorso y ventrocaudal del hipotálamo y en el área homóloga al núcleo paraventricular. En el mesencéfalo, numerosas NIR se detectaron en la capa 6 del tectum óptico, y pocas en la capa 4. En el núcleo laminar del torus semicircular también se localizaron NIR. En el rombencéfalo, las NIR se localizaron en el obex y en los núcleos del tracto solitario. Las FIR de variada densidad se distribuyeron en la mayoría de las subdivisiones del cerebro, pero principalmente con una mayor acumulación de fibras en el palio dorsal, en la parte lateral y medial del cerebro anterior, en la amígdala, el hipotálamo periventricular, la región superficial caudolateral del tallo cerebral, y en el tracto homólogo al tracto solitario. La distribución que presentaron los péptidos derivados de la proencefalina en el cerebro de la Rana esculenta es similar a la reportada en los vertebrados superiores.

Asai y col., (1988), con técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) demostraron el contenido de encefalinas en el cerebro e hipófisis del Ambystoma mexicanum. Ellos reportaron que las concentraciones de met-encefalina eran más altas en el cerebro del axolotl que las de Leu-encefalina, excepto en la hipófisis donde encontraron una proporción de 2.2 de ME por 1 de LE (pmol por g de tejido). La proporción es diferente para lo encontrado en mamíferos que es de 4 ME por 1 LE. Esta concentración de Met-encefalina en la hipófisis es mucho mayor que la contenida en el telencéfalo de la rata.

Con técnicas de inmunofluorescencia León-Olea y col. (1991), demostraron la existencia y distribución anatómica de encefalinas y

endorfinas en la hipófisis del A. mexicanum, reportaron IR a Leu-encefalina en el lóbulo neural, la eminencia media y el lóbulo anterior; la beta-endorfina en todo el lóbulo intermedio y parte del lóbulo anterior, y Met-encefalina y dinorfina A (1-8) únicamente en el lóbulo neural y la eminencia media; estos autores sugieren que la presencia de Leu-encefalina y beta-endorfina en lóbulo anterior podrían tener una función hormonal.

Capítulo III

CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS GENERALES Y NEUROANATÓMICAS DEL AXOLOTL

III.1 Clasificación Taxonomica:

Reino	Animal
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Tetrapoda
Clase	Anfibia
Orden	Urodela (Caudata)
Suborden	Ambystomoidea
Familia	Ambystomidae
Especie	<u>Ambystoma mexicanum</u> (<u>Siredon mexicanum</u>

(Weichert y Presch, 1981)

Durante la evolución de los vertebrados es en la clase de los anfibios donde se encuentra la etapa de transición entre la vida acuática y la invasión a la tierra; este paso obligó a cambios funcionales importantes y originó modificaciones anatómicas notables. Entre las más importantes se cuentan el paso de la natación a la locomoción en cuatro patas, y de la respiración por branquias a la respiración por pulmones.

Los anfibios son organismos que durante su vida larvaria son acuáticos y en la vida adulta son de hábitos semiterrestres. Este cambio de medio está asociado a cambios morfológicos y fisiológicos importantes que permiten al animal adaptarse a medios tan diferentes. El axolotl es un anfibio neoténico, esto quiere decir que no sufre metamorfosis a menos que exista un cambio en las condiciones ambientales o que se induzca experimentalmente, por ejemplo mediante la administración de triyodotiroxina lo que desencadena una serie de

eventos metabólicos que producen la transformación. El axolotl además llega a la madurez sexual en estado larvario y se reproduce conservando su morfología de larva (Smith y Smith, 1971) (fig. 5).

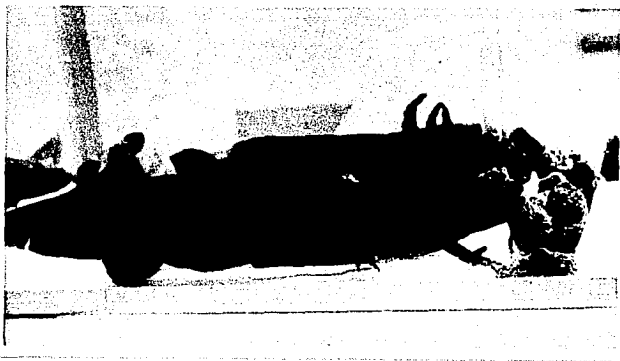


Figura 5 . Aspecto general del axolotl, *Ambystoma mexicanum*.

Existen diferentes especies de Ambystoma: sin embargo, la más conocida es la del axolotl oscuro del Lago de Xochimilco A. mexicanum y la del Ambystoma tigrinum, que son miembros de la gran familia de salamandras, Ambystomatidae que tiene 30 especies distribuidas en América del Norte desde el suroeste de Canadá hasta el sur de México (Smith, 1989).

El nombre vernáculo del Ambystoma mexicanum es axolotl, de origen náhuatl y significa monstruo o agave de doble tallo. Se relaciona con el contexto de lo "feo", en relación al mito del Dios Xolotl que se supone adoptaba formas feas y precedía el nacimiento de gemelos y monstruos (Smith y Smith, 1971). El axolotl fue bien conocido por los indígenas hace miles de años como un importante recurso alimenticio (Brandon, 1989).

El cuerpo de la larva está formado por cabeza, tronco y cola.

Anatómicamente se parece mucho a su forma adulta. Las branquias se encuentran en la parte lateral y posterior de la cabeza y presenta dos pares de extremidades débiles en el tronco (fig. 5). En el estado adulto en su forma terrestre se conoce como salamandra y pierde las branquias, sus extremidades se adaptan para la locomoción y desaparece la aleta dorsal.

III.2 El Sistema Nervioso Central del Ambystoma:

Desde los estudios de Herrick (1948) se sabe que el SNC del Ambystoma contiene ya representadas las partes del SNC de los vertebrados "superiores" como son: telencéfalo, con dos hemisferios cerebrales, y en la porción anterior de cada uno de ellos se encuentran los bulbos olfatorios; el diencefalo que se divide en tálamo, hipotálamo y epitalamo; el mesencéfalo con los colículos superior e inferior y la división de tectum y tegmentum, y el rombencéfalo (Fig. 6).

Análisis por regiones según Judson Herrick (1948):

TELENCEFALO:

En la parte anterior de cada hemisferio cerebral hay un gran bulbo olfatorio. La formación bulbar se extiende hacia la parte posterior en el lado lateral cercano a la mitad de la longitud del hemisferio, en el lado medial se extiende hasta la parte anterior del ventrículo lateral. Bordeando al bulbo olfatorio se encuentra el núcleo indiferenciado olfatorio anterior. La mayoría de las fibras olfatorias periféricas pasan por el núcleo olfatorio anterior, y posteriormente a los tractos olfatorios. El tracto olfatorio esta

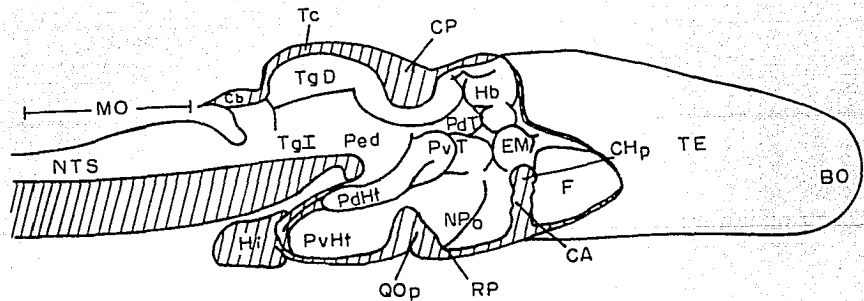
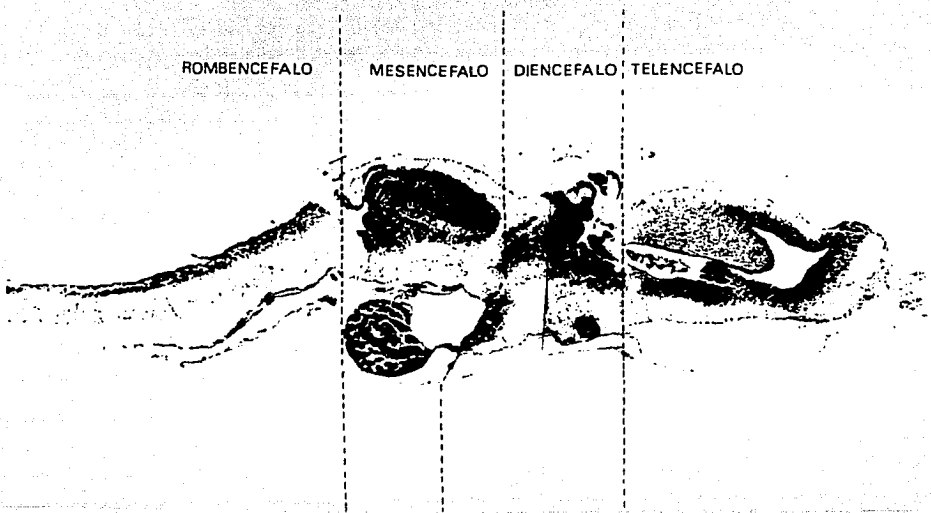


Figura 6. Fotomontaje de un corte parasagital de 10 μ m de espesor del cerebro del axolotl (Carriba), donde se muestran las diferentes estructuras cerebrales, técnica de Nissl. Esquema del cerebro del axolotl (Cabajo), ver abreviaciones (Tomado de Herrick J, 1948).

mezclado con fibras del bulbo y del núcleo anterior, que llegan a todo el hemisferio cerebral, habenula y al hipotálamo. Algunas de estas cruzan en la parte ventral de la comisura anterior y otras en la comisura habenuar (comisura superior telencefálica).

Palio: En las paredes de los ventriculos laterales se encuentran estructuras que muestran estados tempranos de diferenciación con respecto a los núcleos telencefálicos de los mamíferos, como son el complejo estrio-amigdalino en la pared ventrolateral, el septo localizado ventromedialmente, y la parte palial dorsalmente. La parte palial diferenciada de la corteza, no está laminada, pero hay campos paliales bien definidos como: el primordio hipocámpico situado dorsomedialmente, el primordio piriforme dorsolateralmente y entre estos el primordio palial dorsal. La substancia gris está confinada a una capa periventricular delgada, excepto en el sector hipocámpico donde los cuerpos celulares están dispersos dentro de la pared y algunos embebidos en el neuropilo. Esto es un primer paso hacia la diferenciación de la corteza superficial. La homología del sector hipocámpico y piriforme con el de mamífero es clara, por la similitud de sus conexiones nerviosas.

Septo: El septo ocupa la pared ventromedial del hemisferio entre el núcleo olfatorio anterior, la lámina terminal y el área hipocámpico. Su posición y conexiones son similares a las de los mamíferos. Está directamente conectada con el órgano olfatorio por terminales nerviosas, y éste recibe fibras del bulbo olfatorio, núcleo olfatorio anterior, palio e hipotálamo. El principal camino aferente es por el haz del cerebro anterior medial (fascículo medial telencefálico) y para el palio por el fascículo olfatorio septal. Hay también una conexión ancha que cruza la parte ventral del hemisferio con la amígdala y el área piriforme, la banda diagonal de Broca, y una

conexión con la habénula por el tracto olfatorio habenuar anterior y tracto septo habenuar.

DIENCEFALO:

Los límites del diencefalo son: anteriormente la fisura tallo-hemisferica y el borde posterior de la comisura anterior, y en la parte posterior, la cara anterior de la comisura posterior, la eminencia comisural y en la porción ventral el sulcus, el cual marca el borde anterior del pedúnculo cerebelar.

Las cuatro subdivisiones primarias del diencefalo son: 1) el epítalamo dorsal, formado por la habénula y las partes intercalares, y éstas incluyen al núcleo pretectal; 2) parte dorsal tálmica, la cual es el primordio del núcleo sensorial del tálamo del mamífero; 3) partes ventrales tálmicas, y el subtálamo o zona motora del tálamo; 4) hipotálamo.

La habénula recibe fibras del telencefalo, diencefalo y del tectum. La comisura habenuar conecta las dos habénulas y las dos comisuras de la parte palial de los hemisferios, comisura palial posterior y comisura superior telencefalica. El fascículo retroflexo es la parte eferente de la habénula, el cual termina en el pedúnculo cerebral y núcleo interpeduncular. En el cerebro de los vertebrados inferiores el complejo habenuar es uno de los más difundidos. Fisiológicamente es importante para la correlación central. Su función primaria parece ser integrar las actividades de todas las partes del cerebro que están bajo influencias olfatorias con las funciones exteroceptivas del tectum y el tálamo, como el control cerebral superior sobre el músculo esquelético, en las reacciones de alimentación.

Tálamo dorsal: El tálamo se divide en tres sectores : 1) anteriormente, el núcleo pequeño de Bellonci. 2) una parte medial bien definida, y un núcleo sensitivo indiferenciado, el cual es el primordio de muchos de los núcleos sensoriales del tálamo de mamífero, y 3) un sector posterior, el cual contiene el primordio indiferenciado de ambos cuerpos geniculados lateral y medial. Los sectores medio y posterior reciben numerosas terminales y colaterales del tracto óptico, terminales del bulbar general, lemnisco espinal y de los colículos superior e inferior. Estos sectores se conectan ampliamente con el tectum por fibras que corren en ambas direcciones y tienen una pequeña conexión con la habénula. En el sector medio hay un tracto tálamo frontal que va hasta el hemisferio; este es el primordio común de todos los sistemas de proyección tálamo-cortical de mamífero. Hay fibras aferentes que van hasta el tálamo ventral, hipotálamo, pedúnculo y tegmentum. Las conexiones con el tegmentum dorsal e istmo probablemente cooperan en el patrón de reflejos locales, particularmente supliendo el componente visual de la reacción de alimentación.

Tálamo ventral: La parte anterior y la posterior del tálamo ventral tienen un origen embrionario distinto. Ambos sectores están incluidos en la zona motora. El tálamo ventral es el primordio del campo motor del subtálamo del mamífero. El sector anterior contiene un núcleo relacionado con la estria medular y amígdala, cerca de éste, la eminencia tálamica, de donde nacen los tractos relacionados con el primordio hipocámpico. El tálamo ventral y los pedúnculos de los urodolos forman una columna de sustancia gris la cual está anatómicamente bien definida. De estas estructuras deriva filogenéticamente la región donde reside el control de los movimientos coordinados de la musculatura del globo del ojo, del tronco y las

extremidades en el cerebro humano.

Hipotalámico. Incluye la parte ventral del tallo cerebral entre la comisura anterior y el tubérculo posterior. En su borde antero dorsal el núcleo del tracto olfato habenuar, incluido en el tálamo ventral. Caudal al quiasma está el surco hipotalámico que separa al hipotálamo en porción ventral y dorsal. El hipotálamo dorsal contiene un primordio de los cuerpos mamilares y una estructura indiferenciada. El hipotálamo ventral está dividido en dos partes: la parte posteroventral y la antero dorsal que en el Ambystoma no son claras. El núcleo preóptico está separado por el surco preóptico en lóbulo anterior y posterior. Ninguno de los núcleos hipotalámicos descritos en mamíferos están separados claramente en el Ambystoma. El núcleo preóptico es la excepción, por ser grande y bien definido.

Los hemisferios cerebrales están conectados con el hipotálamo por medio de fibras que pasan en ambas direcciones formando un haz en el cerebro anterior medial, el sistema estrío terminal, y el sistema del fórnix. Los tractos grandes del tálamo y el tectum también terminan aquí, de tal modo que todo tipo de experiencias sensoriales del animal están representadas en el hipotálamo. Estas experiencias están organizadas aquí en términos de respuesta visceral. El tracto eferente va al pedúnculo, tegmentum, núcleo interpeduncular, y fibras descendentes del neuropilo profundo precursoras del fascículo longitudinal dorsal de Schütz y un tracto hacia la hipófisis que rige el control nervioso de las actividades neuroendócrinas.

El sector medio del tallo cerebral: diencéfalo, mesencéfalo e istmo regula e integra a los núcleos que participan en el sistema funcional sensorial y motor de ajuste. Las conexiones periféricas más importantes son con los ojos, y éstos, en muchos vertebrados, juegan un papel importante para mantener un ajuste exitoso.

En todos los vertebrados inferiores el techo del cerebro medio, el tectum, es el centro de regulación de la respuesta motora para el sistema exteroceptivo de los órganos de los sentidos. El hipotálamo se encarga de la regulación olfato-visceral. El modelo de respuesta motora de estos grupos de receptores se lleva a cabo en el pedunculo cerebral y tegmentum. La regulación de los sistemas propioceptivos radica en el cerebelo.

MESENCEFALO

El mesencéfalo está limitado anteriormente por la comisura posterior, caudalmente por la flexión externa del istmo, el surco del istmo ventricular y ventralmente por la fovea istmica. Estos límites son más prominentes en la larva que en el adulto. El mesencéfalo incluye el núcleo pretectal, el tectum mesencéfalico (lámina cuadrigémina) el tegmentum dorsal (área subtectal), el área circundante al tubérculo posterior, la flexión ventral cerebral, denominada "núcleos del tubérculo posterior," los núcleos interpedunculares y los pedunculos.

Tectum y Núcleo pretectal: El tectum y el núcleo pretectal, están relacionados con el tálamo dorsal donde se encuentra todo el sistema sensorial exteroceptivo, que integra el control cerebral del sistema sensorimotor inferior involucrado en la operación del músculo esquelético. El tectum mesencéfalico del Ambystoma tiene una parte óptica grande el colículo superior y una parte pequeña pobremente diferenciada el colículo inferior. Está relacionado con el tectum óptico y el cerebelo, esta conexión sugieren que la función más primitiva es propioceptiva. El tracto óptico, el lemnisco y numerosas fibras terminan en una lámina ancha del neuropilo intermedio, el cual

se extiende dentro del tectum, homogéneamente. Las fibras del tectum divergen de este en todas direcciones. El núcleo pretectal recibe fibras directamente de la retina, del tectum, de la habénula y de los hemisferios cerebrales. Las fibras eferentes van al tectum, tálamo, hipotálamo y pedúnculo cerebral. Forman parte del aparato de regulación de la musculatura intrínseca del globo del ojo. El tálamo recibe fibras de la retina, y está ampliamente conectado con el tectum por fibras no cruzadas pasando en ambas direcciones por el colículo superior e inferior. Hay también un sistema de tractos tectum tálamico e hipotalámico y talamo hipotalámico los cuales cruzan en la comisura postóptica, algunas de estas fibras cruzan hasta el pedúnculo y tegmentum istmico.

Núcleos interpedunculares: Los núcleos interpedunculares en los urodolos son de gran tamaño, son interístmicos, y se extienden de la fovea ístmica hacia la raíz del quinto nervio. El neuropilo interpeduncular es arborizado por terminaciones que se ramifican en la parte ventromedial y con componentes axónicos procedentes de diversas regiones.

Pedúnculo: Es una columna bien definida de células diferenciadas en la terminación anterior y en la placa basal del tubo neural embrionario. Se localiza en la parte superior de la columna motora primaria (de Coghill), la cual en todos los vertebrados desde estados embrionarios tempranos hasta el adulto, contienen los núcleos del nervio oculomotor y una masa de tejido nervioso que activa el área de movimientos de locomoción. Esta estructura mantiene el control cerebral del segmento bulbo-espinal inferior del sistema lateral, y algunas otras funciones motoras también representadas aquí. Dentro de éste convergen fibras de todas partes del cerebro, al mismo tiempo que salen cuatro grupos de fibras: 1) tracto ventro medial que va a la

médula oblongada y cordón espinal; 2) el nervio oculomotor que inerva a los músculos intrínsecos y extrínsecos del globo ocular. Asociado con estas fibras periféricas esta la conexión central con el núcleo de los nervios IV y VI, que están ordenadas de tal manera, que se pueden ejecutar movimientos conjugados en el ojo; 3) fibras sensoriales y gustatorias viscerales que van al pedúnculo, y con estas se relacionan fibras aferentes del hipotálamo, en niveles inferiores de la zona motora; 4) de ambos talamo ventral y pedúnculo, salen fibras que se dirigen a varias partes circundantes, que coordinan actividades reflejas locales con las funciones pedunculares básicas. En el borde ventrolateral del pedúnculo en el neuropilo superficial, termina el tracto óptico basal, el tracto secundario, el tracto terciario visceral gustatorio y algunas fibras del fascículo retroflexo.

El tercer nervio craneal se origina dentro del pedúnculo y emerge cerca de la fóvea istmica.

Istmo: El istmo en su porción dorsal es pequeño, contiene un segmento del núcleo del V par mesencefálico y el núcleo de los nervios de los plexos coroides y meninges cerca del velo medular superior. Seguido de este, está el núcleo superior visceral-gustatorio y el núcleo istmico que es un núcleo indiferenciado. La parte ventral del istmo es grande, y aquí se encuentra el núcleo del cuarto nervio y una masa de células tegmentales. Este tegmentum istmico está entre el sistema sensorial motor primario de la médula oblongada y el cerebro medio, sirve como un intermediario entre ellos. Hay un gran núcleo central de células pequeñas las cuales reciben fibras de una amplia variedad de centros de correlación. Estos entran por los fascículos tegmental dorsal y otras vías. Este núcleo está envuelto por un grupo de células grandes, las cuales se continúan posteriormente con células tegmentales similares de la región del trigémino. El complejo tiene

dos funciones importantes: 1) Organizan los reflejos locales de la musculatura de la cabeza, particularmente los de la alimentación. 2) integra las funciones de diferentes estructuras que en los mamíferos esta representado por los núcleos tectum dorsal y fascículo longitudinal dorsal de Schütz.

CEREBELO

El cerebelo es pequeño y con una organización simple. sin embargo las principales características estructurales del mamífero están presentes en el Ambystoma, excepto el sistema pontil. El cerebelo en el urodelo consiste de tres partes: 1) el cuerpo medio. Al que llegan fibras procedentes de la médula espinal, nervio trigeminal y tectum; 2) las aurículas laterales, que están ensanchadas en la parte anterior por las terminales que provienen de la zona sensorial de la médula oblongada; y 3) ventralmente del cuerpo del cerebelo, un núcleo cerebelar, el cual es el primordio del núcleo cerebelar profundo del mamífero. No se encuentran los primordios del núcleo rojo ni de las olivas inferiores. Este cerebelo primitivo presenta el patrón típico de los vertebrados en la localización del sistema vestibular lateral y otros sistemas mediales.

ROMBENCEFALO

Médula oblongada. La médula oblongada, o bulbo raquídeo, se sitúa entre el istmo y el "calamus scriptorius" excepto el cerebelo; no existe el puente. En su parte dorsal reúne las fibras sensoriales que vienen de la cabeza excluyendo las fibras ópticas y olfatorias. sobre el cuerpo de la médula oblongada están las fibras que provienen

de los núcleos de la línea lateral, y las fibras sensoriales viscerales se sitúan por el camino del vago. La raíz de fibras sensoriales viscerales generales y gustatorias están separadas de las otras en el fascículo solitario, este grupo tiene un sistema de fibras secundarias, las cuales convergen dentro del núcleo motor visceral de la médula oblongada y de la médula espinal. También está el tracto visceral ascendente que va al istmo, pedúnculo, e hipotálamo, a través del cual las actividades cerebrales pueden ser influenciadas por las funciones viscerales y gustatorias (Opdam y col., 1976).

La unión bulbo-espinal incluye los segmentos superiores del cordón espinal y la parte inferior de la médula oblongada. Este es el primer centro de correlación que es funcional durante el desarrollo embrionario. Su parte dorsal alrededor del calamus scriptorius recibe fibras de toda la zona sensorial del bulbo y cordón espinal, por lo que esta sustancia gris del núcleo runcular y comisural es un centro de integración de las funciones exteroceptivas, propioceptivas y viscerales del cuerpo, excepto la visión y el olfato. Estas funciones integran los reflejos posturales, de locomoción, actividad visceral, y otros componentes básicos del tipo masa-movimiento. Las fibras eferentes del núcleo dorsal se dirigen hacia el cordón espinal y hacia adelante. Estas últimas hacen conexión con el núcleo motor de la médula oblongada, otros van hacia el cerebelo, tectum y tálamo, y una conexión visceral-gustatoria hacia el istmo y el pedúnculo. La zona motora de este sector está ocupada principalmente por fibras de paso.

EL CORDON ESPINAL. Los segmentos del cordón están organizados para la regulación de los reflejos locales de las extremidades y la integración de estos reflejos entre ellos mismos y con la acción de la musculatura del tronco, como en la locomoción ordinaria.

Ventriculos. Los ventriculos laterales del hemisferio cerebral

tienen la forma típica excepto en el foramen intraventricular. La comisura anterior e hipocampal no cruza sobre la lámina lateralis, cruza en el borde comisural; y entre estas estructuras hay una ancha depresión comisural, dentro de la cual se cierra el "foramen interventricular". El tercer ventrículo se expande en sentido dorsal. En sentido ventral, el alargamiento del núcleo preóptico da lugar a un receso preóptico grande entre la comisura anterior y el lomo del quiasma, enfrente de este hay un receso lateral óptico. El cuarto ventrículo es de forma típica excepto en sentido anterior, donde el receso lateral ancho con el techo membranoso se extiende hacia afuera y adelante para cubrir íntegramente la parte dorsal del lóbulo auricular.

OBJETIVOS:

El objetivo de la presente tesis es localizar en las diferentes estructuras del Sistema Nervioso Central del axolotl Ambystoma mexicanum, la existencia de péptidos opioides, así como las características morfológicas de las células que los contienen y su distribución anatómica en el tejido nervioso; como ejemplo de un organismo anfibio neoténico cuyas características tanto ontogénicas como filogénicas permiten proponerlo como un modelo para el estudio de los péptidos opioides tales como: la Leu-encefalina y la Met-encefalina .

Capítulo IV

MATERIAL Y METODO

Se llevaron a cabo dos estudios, uno histológico y otro inmunohistoquímico. En el estudio histológico se elaboraron cinco seriaciones del cerebro del axolotl en las cuales se aplicaron diferentes técnicas de tinción. Este estudio se utilizó para comparar las estructuras cerebrales del Ambystoma tigrinum, estudiado por Herrick (1948), con las del A. mexicanum y así poder validar la utilización del atlas para el A. tigrinum con el fin de ubicar las estructuras cerebrales que contenían células y fibras inmunorreactivas. En el estudio inmunohistoquímico se llevaron a cabo una serie de experimentos con anticuerpos anti-LE y anti-ME para determinar la existencia y localización de encefalinas en el SNC del Ambystoma mexicanum.

Los axolotls, de la especie Ambystoma mexicanum, fueron obtenidos del lago de Xochimilco en México, D.F. y mantenidos en un acuario abierto con una temperatura de 18 a 20 °C, con un ciclo artificial de luz/obscuridad 10/14h y alimentados con peces pequeños vivos, artemia salina y pedazos de hígado de pollo.

IV.1 Estudios Histológicos

Para este estudio se utilizaron 5 axolotls, de ambos sexos, de 60-100 g de peso corporal y de 18-20 cm de longitud. Se anestesiaron con una solución de benzocaína al 0.02% por inmersión (Vanable, 1985) y se perfundieron por vía intra-cardíaca, primero 150 ml de solución salina (cloruro de sodio al 0.9 %) con 30 U.I. de heparina (Heparth

5000 U.I./ml) y posteriormente 150 ml de solución fijadora de formol al 10% en PB 0.1% M pH 7.4. La disección del cerebro se llevó a cabo por la parte dorsal de la cabeza. Se separó la piel y tejido muscular. se removió el cartilago craneal. se cortaron los nervios craneales y se extrajo el cerebro. Se postfijo por 24 hrs en la misma solución fijadora. después de la postfijación las piezas se equilibraron en soluciones de sacarosa al 12%, 16% y 18%; posteriormente se incluyeron en alcohol polivinílico. (medio de inclusión hidrosoluble "Tissue tek". Laboratorios Miles) y se congelaron rápidamente a -18 °C. Se obtuvieron cortes coronales, transversales y parasagitales de 20 µm con un criostato Leitz modelo 1720 a una temperatura de -16 a -18 °C. se montaron directamente en portaobjetos previamente cubiertos con una solución al 2% de gelatina-cromoalumina.

Se realizaron cinco series de cortes en donde cada una de ellas tenía un corte cada 100 µm y se aplicaron las siguientes técnicas de tinción: tinción rápida de Nissl, hematoxilina-eosina, Bodian y Klüver-Barrera. (Luna, 1968; ver anexo). Posteriormente se realizaron esquemas que se obtuvieron por medio de una ampliadora fotográfica (Leitz). utilizando el portaobjetos como negativo y dibujando la proyección sobre papel. Estos esquemas se utilizaron para marcar los sitios donde se encontraron fibras y neuronas inmunorreactivas en el estudio inmunohistoquímico (Figs. 12, 13 y 14).

IV. 2 Estudio Inmunohistoquímico.

En este estudio se utilizaron 10 animales. de ambos sexos. de 50-100 g de peso corporal de 18-20 cm de longitud. Nueve de ellos fueron pretratados con colchicina i.m. 15µg/20µg. en sol. salina.

dos dosis diarias durante tres días. (Hanson y col., 1977). Los axolotls fueron anestesiados con una solución de benzocaina al 0.02% por inmersión durante 10 min. y se perfundieron por vía intra-cardíaca, primero con 100 ml de solución salina (cloruro de sodio al 0.9 %) más 30 U.I. de heparina, seguida de una solución fijadora: 150 ml de paraformaldehído al 4% en buffer fosfatos (PB) 0.1 M pH 7.4. Se obtuvo el cerebro de la misma manera que para los cortes histológicos. El cerebro se post fijó por 12 hrs en la solución fijadora y se equilibró en soluciones de sacarosa al 12%, 16% y 18%; posteriormente se incluyeron en "tissue tek" y se efectuaron cortes coronales, transversales y parasagitales de 12-15 μ m de espesor con un criostato Leitz modelo 1720 a una temperatura de -16 a -18 °C y se montaron en portaobjetos gelatinados.

Se montaron de manera seriada. Cada uno de los cortes se monto en diferente portaobjetos, el primero en el portaobjetos número 1, el segundo en el 2 y así sucesivamente hasta llegar al portaobjetos número 20. Después se inició nuevamente con el primer portaobjetos hasta obtener 4 filas con 4 cortes en cada uno de los portaobjetos, esto con el fin de obtener cortes seriados en diferentes portaobjetos que se incubaron con diferentes anticuerpos y controles para que pudieran ser comparados.

La inmunohistoquímica se llevó a cabo con el protocolo siguiente:

-Después de haber cortado el tejido.

-Se secaron las preparaciones por 30 minutos.

-Se lavaron con PBS con 0.3% de Tritón X-100 por 10 minutos.

-Se incubaron con los primeros anticuerpos (Ac) (LE y ME) hecho en conejo, en una cámara húmeda a 4°C por 24 h (Fig. 7).

-Se lavaron con PBS Triton X-100 por 10 min.

- Se incubaron con el segundo Ac en cámara húmeda a 37° C por 2 h (IGg H+L hecho en cabra contra conejo y conjugado a isotiocianato de fluoresceína o rodamina Lab. ICN) en una dilución de 1:100.
- Se lavaron con PBS Triton por 10 min.
- Se montaron con glicerina

Se realizaron diferentes controles: a) omisión del primer anticuerpo. b) omisión del segundo anticuerpo. c) preadsorción del primer anticuerpo con un exceso (10 a la -4 M) de su péptido sintético específico. (Tabla V). d) control Buffer. (todo el experimento se corrió únicamente con PBS tritón, esto con el fin de observar la fluorescencia nativa).

Los resultados de los controles de especificidad de los antiseros por preadsorción e incubados en los cortes histológicos se resumen en la tabla V.

Las estructuras en las que no se observó fluorescencia después de haber realizado la preadsorción del primer anticuerpo con su péptido sintético específico se consideraron específicamente inmunorreactivas. La observación se hizo en un microscopio Leitz, Labourlux 12 equipado con una lámpara de vapor de mercurio de 50 W. y un bloque de filtros I-2 que tiene un rango de excitación u.v. azul, un filtro excitador entre la banda de 450 a 490 μm ., espejo divisor de rayos RKP (filtro de reflexión de ondas cortas) de 510 μm ., un filtro supresor LP (filtro de paso de ondas largas) 515 μm . y filtro de excitación IKP (filtro de alta eficiencia para interferencia de ondas cortas), filtro supresor F (combinación de filtros de gelatina).

Se tomaron fotomicrografías con el dispositivo para fotografías del microscopio y cámara Leitz de 35 mm. en color con película Ektachrome 400. y en blanco y negro con película tri-X pan 400 ASA.

Técnica Indirecta de Inmunofluorescencia

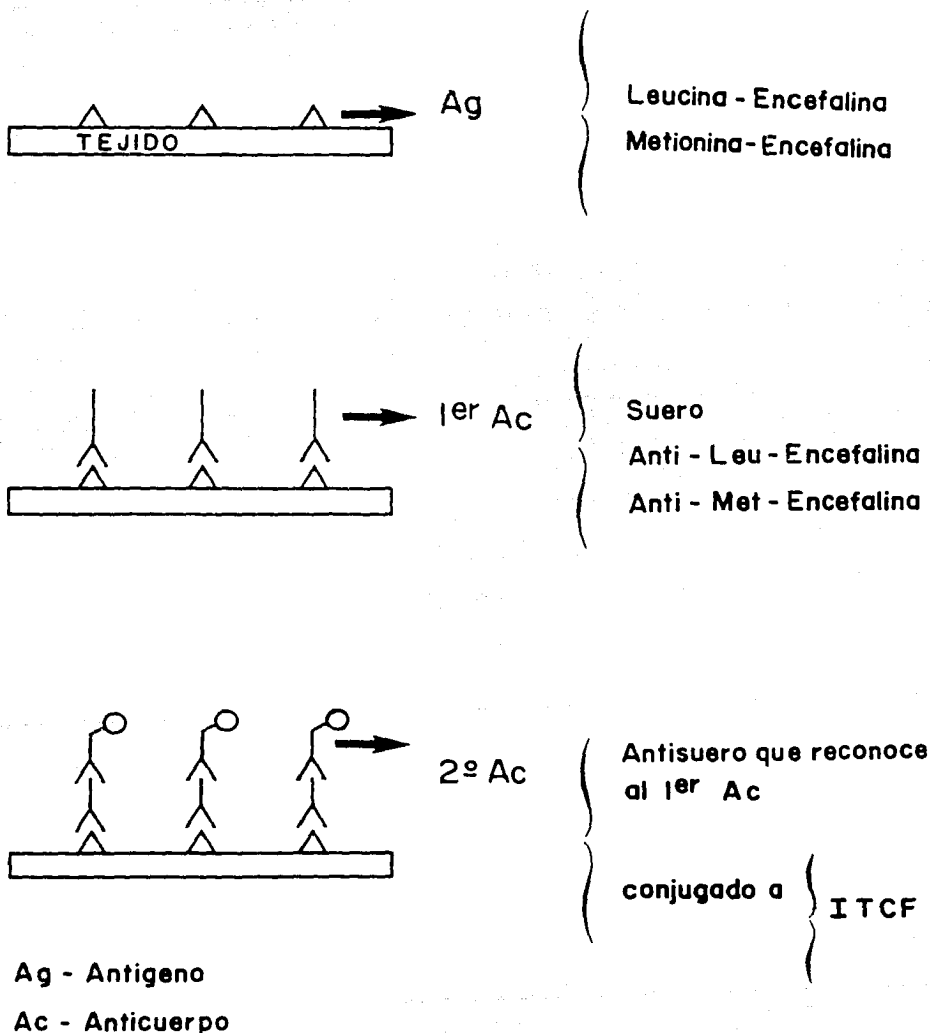


Figura 7. Esquema donde se muestran los pasos de la técnica indirecta de inmunofluorescencia.

IV.3 Especificaciones de los Antisueros

Se utilizaron antisueros policlonales contra Leu-encefalina y Met-encefalina (LE y ME). Los antisueros para LE y ME fueron donados por el M. en C. Miguel Asai del laboratorio de Analisis Químicos del IMP. Estos anticuerpos fueron desarrollados en conejos de Nueva Zelanda, inmunizados previamente con cada uno de los pentapéptidos LE y ME unidos a albumina sérica bovina (BSA) y glutaraldehído, siguiendo el protocolo de inmunización descrito por Vindrola y col. (1981).

Bajo condiciones de radioinmunoanálisis el antisuero para LE tiene un 100% de cruzamiento con LE, 5.9% de cruzamiento con la ME, 1.4% con la DI 1-13, y menos de 0.01% de cruzamiento con Alfa, Beta y Gama endorfinas. El anti-ME presentó un 100% de cruzamiento con (Met (0) encefalina); 0.3% con LE y menos de 0.01% con ME- Arg2, LE-Arg6, Dinorfina 1-13 (DI), Alfa, Beta y Gama endorfinas (BE, GE) (Asai y col., 1988).

Se realizaron experimentos de preabsorción directa para obtener la especificidad de los anticuerpos a nivel histológico. Estos consistieron en la preincubación del antisuero a una dilución de trabajo (para LE, BE y DI 1:100; ME 1:50) con un exceso del péptido sintético correspondiente (Laboratorios Sigma) e incubando esta solución a 4 °C por 24 h. Posteriormente se utilizó esta solución en el tejido en lugar del primer anticuerpo siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección IV.2. Los resultados se presentan en la tabla V.

Se realizaron experimentos para determinar las concentraciones óptimas de los anticuerpos, en éstos se utilizaron diluciones crecientes de los diferentes antisueros resultando esto en una

disminución gradual hasta la desaparición de la tinción inmunológica. Se escogió la dilución óptima de trabajo, siendo ésta de 1:100 para el anti-LE, para el anti-ME 1:50, y de 1:100 para el anti-conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las diluciones se hicieron con solución amortiguada de fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.4 más tritón X-100 a una concentración de 0.3%.

RESULTADOS

V.1 Resultados de los Estudios Histológicos.

Las series de cortes del cerebro del A. mexicanum, procesadas con las técnicas de H-E, Nissl, Bodian y Klüver-Barrera, se realizaron con el fin de identificar y localizar los diferentes núcleos y tractos cerebrales y compararlos con los del atlas del cerebro del A. tigrinum de Herrick J. 1948. Este atlas sirvió como base para la localización anatómica de las neuronas y fibras inmunorreactivas a los péptidos opioides en las diferentes estructuras cerebrales.

Se encontró una gran similitud anatómica de los diferentes núcleos y tractos nerviosos del Ambystoma mexicanum con los del A. tigrinum, en cuanto a forma, localización topográfica y tamaño.

V.2 Resultados de los Estudios Inmunohistoquímicos.

Pruebas de Preadсорción:

Estas pruebas se hicieron preadsorbiendo en un tubo de ensayo el antisuero a la dilución de trabajo con los péptidos sintéticos LE, BE, ME y DIN (1-8) e incubando esta solución en el tejido en lugar del primer antisuero. Se valoraron los cambios en la intensidad de la fluorescencia cualitativamente (disminución) comparando los cortes controles con los experimentales con IR positiva.

Los controles de especificidad de los antisueros por

preadsorción mostraron que bajo condiciones inmunohistoquímicas y utilizando una dilución de 1:100 del antisuero-LE y una concentración de antígeno de 10 a la -4 M (ME y DIN sintéticas) disminuye la fluorescencia muy levemente. Esto quiere decir que tanto ME como DIN cruzan con el antisuero de LE bajando la intensidad de la fluorescencia de ++++ a +++. Al cruzar el antisuero de LE con BE no observamos ningún cambio en la fluorescencia (Tabla V). El anti-ME a una dilución de 1:50 cruzó levemente con LE bajando la intensidad de la fluorescencia de ++++ a +++. no se observaron cambios en la fluorescencia al preadsorber el antisuero de ME con BE y con DIN (Tabla V).

TABLA V.

EFFECTO DE LA PREADSORCION DIRECTA Y CRUZADA DE LOS ANTISUEROS DE LE , Y ME CON LOS PEPTIDOS SINTETICOS LE, BE, ME Y DIN (1-8) HOMOLOGOS SOBRE LA INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA.

ANTISUEROS	PEPTIDOS			
	LE	BE	ME	DIN
Anti-LE	-	++++	+++	+++
Anti-ME	+++	++++	-	++++

Notaciones: ++++ máxima fluorescencia, +++ disminución parcial de la fluorescencia, - ausencia de la fluorescencia.

V.2.1 Distribución regional de la IR a Leu- y Met-encefalina en el cerebro del axolotl.

La identificación de neuronas y fibras inmunorreactivas (NIR y FIR) se realizó en cortes coronales, transversales y parasagittales de 10-15 μ m de espesor.

La densidad de fibras se menciona cualitativamente como: escasa (+), ligera (++) , densa (+++) y muy densa (++++) dependiendo de la cantidad de fibras inmunorreactivas presentes en cada región

cerebral.

La inmunorreactividad (IR) a leu- y met- encerhalinas (LE,ME) se distribuyó en las mismas regiones cerebrales del axolotl (Ambystoma mexicanum).

Las neuronas que presentaron IR tanto para LE como para ME. fueron monopolares y pseudomonopolares, de 15-25 μ m de diámetro. La IR se distribuyó homogéneamente en el citoplasma del soma neuronal, en sus fibras y terminales; el núcleo no presentó IR. (fig.9d).

Bulbo olfatorio y telencefalo:

En los bulbos olfatorios (BO) se encontró una ligera densidad (++) de FIR a LE. distribuidas a todo lo largo de los bulbos. En el límite de esta estructura y el núcleo olfatorio anterior (NOA) en el fascículo postolfatorio (FOI). presentó FIR con una ligera densidad (++) (fig.8a). Este fascículo tiene una orientación transversal por lo que en el corte parasagital (Fig.14) estas fibras están cortadas transversalmente.

En el telencefalo se encontró una amplia distribución de FIR a LE. con diferentes densidades en cada una de las regiones. con una mayor densidad (+++) de FIR en la region ventrocaudal.

En el área palial dorsal (PD) existe una escasa densidad (+) de FIR a LE. y una densidad ligera (++) en la parte media dentro del palio hipocampal (PHp) (fig.8c). además de NIR aisladas localizadas cerca de los ventrículos laterales (VL) (fig.8c). La zona ventromedial, dentro de la comisura hipocampal (CHp) y la comisura anterior (CA) presentaron una mayor densidad (+++) de FIR (fig.8d). En la parte ventrocaudal, en la zona estriomgdalina (CEAm) (fig.14) y en los núcleos septales (NS) y acumbens (NAc) se encontró una alta

densidad (++++) de FIR, con un aumento progresivo en la densidad de FIR hacia la parte caudal del telencéfalo (fig.8b,e).

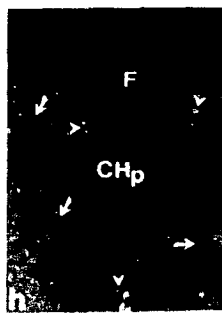
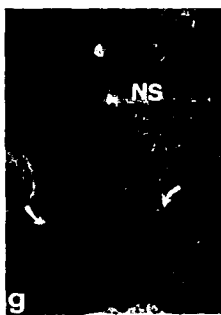
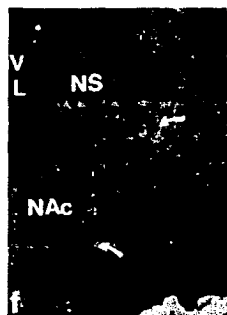
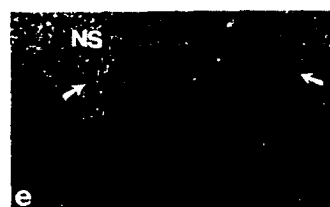
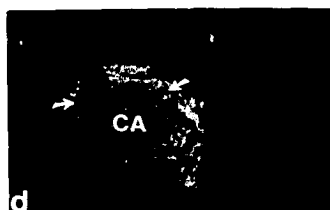
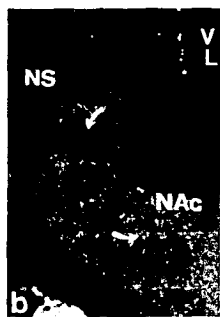
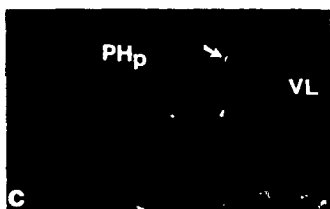
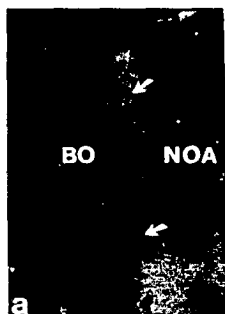
La distribución de FIR y NIR a ME, en los bulbos olfatorios y telencéfalo, es similar a LE, con una variación ligera en la densidad de FIR, aparentemente menor para ME (fig.8f,g,h). No encontramos coexistencia en las mismas neuronas de la IR a LE y ME en la comparación de los cortes seriados.

Figura 8. Fotomicrografías del telencefalo del axolotl, *Ambystoma mexicanum*, donde se muestran las neuronas y las fibras inmunorreactivas (NIR, FIR) a LE y ME.

Inmunorreactividad a LE. a. FIR (↑) en el fascículo olfatorio localizado entre el bulbo olfatorio (BO) y el núcleo olfatorio anterior (NOA). b. Parte anterior del núcleo septal derecho (NS) y núcleo acumbens (NAc) con FIR (↑) (+++). c. NIR (↑) en el palio hipocampal (PHP) cerca del ventrículo lateral (VL). Nótese la escasa densidad de FIR (↑) en el neuropilo. d. Comisura anterior (CA) con FIR (↑) (+++). e. FIR (↑) en la porción caudal de los NS. Nótese la alta densidad de FIR (↑).

Inmunorreactividad a ME. f. Porción ventromedial anterior del NS, se observan FIR (↑) (+++). g. Parte caudal de los NS. Nótese la alta densidad de FIR. h. Corte horizontal a nivel de la comisura hipocampal (CHp) donde se observa NIR (↑) y FIR (↑) (+++).

Cortes. coronales: c, b, e, f, g ; transversales: h ; parasagittales: a, d. Aumentos: 100x= a, b, d, e, f, g; 250x= c. Densidad de las FIR, += escasa, ++= ligera, +++= densa, ++++= muy densa. Todos los cortes tienen un espesor de 12-15µm.



Diencéfalo:

El diencéfalo es la estructura cerebral donde se encontró una mayor concentración de neuronas y fibras IR a LE y ME.

En el núcleo preóptico (NPO) se encontró una alta densidad (++++) de FIR a LE y de 2 a 4 NIR por corte, alrededor del receso preóptico (RP) (fig.9a). El tracto preóptico (TPO) presentó una alta densidad (++++) de FIR, al igual que el tracto estriotegmental, en el cual se observó una ancha banda de FIR que se cruzan en la línea media, y se dirigen hacia ambos hemisferios cerebrales.

En el epitálamo, los núcleos habenuares contienen una gran densidad (++++) de FIR a LE. En la parte dorsal del tálamo (PdT) encontramos una ligera densidad (++) de FIR a LE, mientras que la parte ventral (PvT) presentó una densidad mayor (+++) (fig.9b) y grupos de 1-5 neuronas (NIR) por corte, localizadas en las primeras capas de neuronas (2a y 3a), alrededor del tercer ventrículo (fig.9e).

En el núcleo paraventricular hipotalámico (NPvHt) se encontró una alta densidad (++++) de FIR a LE (fig.9c). En este núcleo se observaron algunas fibras gruesas con fuerte IR y neuronas inmunorreactivas distribuidas en grupos (1-6 neuronas) localizadas en toda la sustancia gris (fig.9c,d). En la región ventral hipotalámica (Ht) cerca del infundíbulo (In), existe un gran número de NIR pequeñas (de 10 o más neuronas por corte) distribuidas en toda el área (fig.9g). Existe un grupo de neuronas (15 aprox.), cuyas terminales se dirigen hacia el infundíbulo (In) y parecen vertir su contenido en él (fig.9h). Algunas de ellas presentan otra prolongación hacia la parte ventral. En esta región se encontró una alta densidad (++++) de FIR (fig.9i).

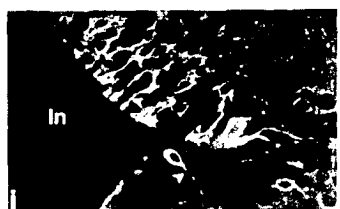
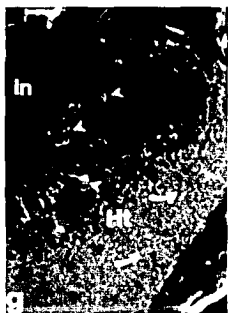
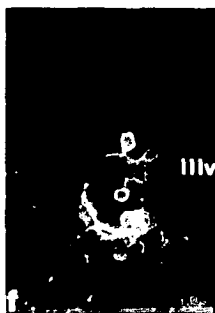
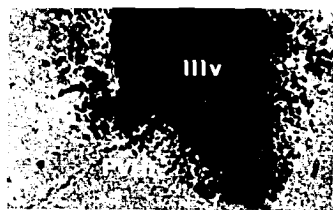
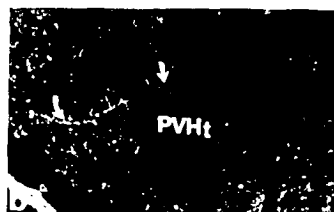
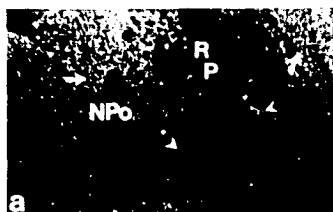
La distribución de la IR a ME en el diencefalo fué similar a la IR a LE. con ligeras variaciones en el número de NIR y la densidad de FIR siendo mayor para ME.

Figura 9. Fotomicrografías del diencefalo del axoloti, *Ambystoma mexicanum*, donde se muestran las neuronas y las fibras inmunorreactivas (NIR), FIR a LE y ME.

Inmunorreactividad a LE. a. Núcleo preoptico (NPO) con una red densa de FIR (↑), las NIR (∧) se localizan por debajo de las células ependimarias del receso preoptico (RP). b. FIR (↑) (++++) en el núcleo paraventricular hipotalámico (PvHt). c. PvHt donde se muestra NIR (∧) grandes (25µm) y FIR (↑) (++++) en el neuropilo. d. Estas mismas neuronas a un mayor aumento (400x). Nótese el citoplasma (∧) y las prolongaciones (↑) inmunorreactivas. e. Grupo de NIR (∧) (de 5-10 neuronas) en el núcleo talámico ventral (Tv) cerca del tercer ventrículo (IIIv).

Inmunorreactividad a ME. f. En el PvHt. Se observa un grupo de NIR (∧) (de 5-10 neuronas) cerca del tercer ventrículo (IIIv) y FIR (↑) (++++), g. NIR (∧) y FIR (↑) (++++) distribuidas en la parte ventral del hipotálamo (Ht). h. Se observa una NIR (∧) en el Ht en la pared infundibular. Nótese cómo dirige su terminal hacia el infundíbulo (In) como si estuviese liberando su contenido. i. Grupo de NIR (∧) (10 o más neuronas) localizadas en la parte dorsal del Ht. Nótese cómo algunas neuronas dirigen sus terminales (∧) hacia el In y otras hacia la parte ventral del Ht.

Cortes. Coronales: a,b,c,d,f,g,h,i: parasagitales: e. Aumentos: 100x= a,c,h; 250x= d,e,f,i; 400x= b,g. Densidad de las FIR, += escasa, += ligera, +++= densas, ++++= muy densa. Todos los cortes tienen un espesor de 12-15µm.



Mesencefalo :

En el mesencefalo se encontraron FIR con una ligera densidad (++) a LE localizadas en el tectum (Tc) (Fig.10 a), y neuronas aisladas (1 por corte) con una IR a LE poco brillante situadas en el limite de la substancia gris dentro de la capa 6 y 7 (Fig.10 a,b) (Roth y col., 1990).

En el tegmentum dorsal (TgD) se observo una escasa densidad de FIR (+) con neuronas inmunorreactivas aisladas en las ultimas capas dentro del tegmentum istmico (TgI) (Fig.10c,d). En los núcleos interpedunculares (NI) hay una mayor densidad (+++) de FIR a LE distribuidas en toda el area, con neuronas (1-5 por corte) de baja IR a LE localizadas en la porción rostral de la substancia gris de estos núcleos. En el istmo (Is) dentro del tegmento istmico (TgI) existen FIR (++) a LE.

Los resultados de la IR a ME demostraron una distribución anatómica similar a la obtenida para LE, que varia ligeramente en la densidad de FIR (Fig.10 h,i) y el número de neuronas, siendo mayor para ME (Fig.10 f,g).

Cerebelo:

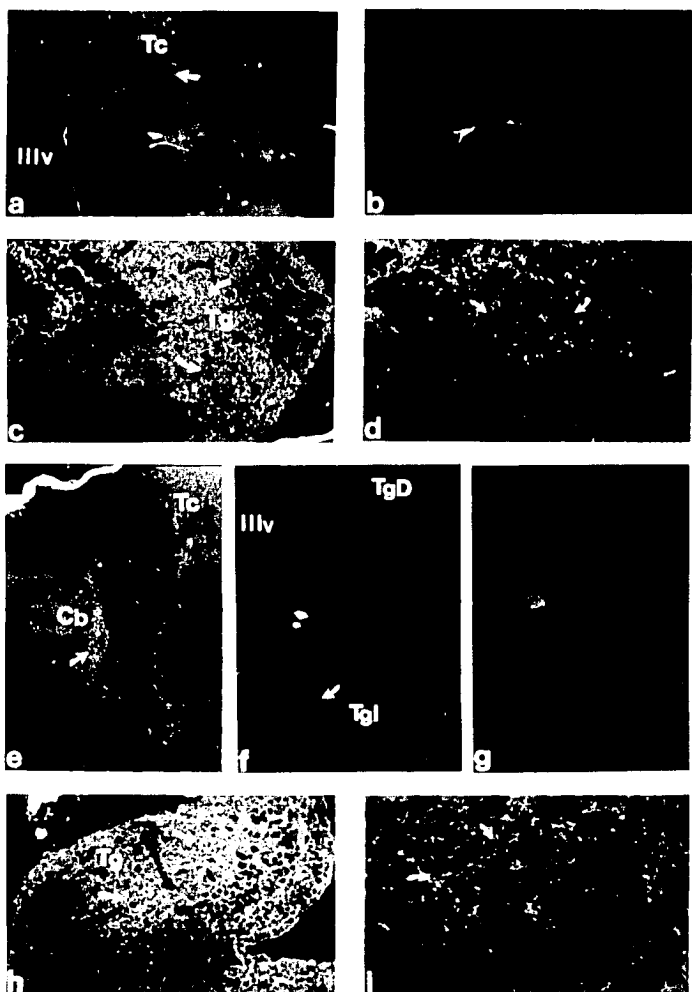
El núcleo cerebeloso (Cb) presentó una escasa densidad (+) de FIR a LE en la comisura cerebelosa (Fig.10 e), tanto para LE como para ME.

Figura 10. Fotomicrografías del mesencéfalo del axoloti, *Ambystoma mexicanum*, donde se muestran las neuronas y fibras inmunorreactivas (NIR y FIR) a LE y ME.

Inmunorreactividad a LE. a. Tectum (Tc). en la capa 6 se observa una neurona inmunorreactiva (^) . y una ligera densidad de FIR (↑) en las capas 5 y 4. b. Se observa la neurona anterior a un mayor aumento (400x). Notese la prolongación fuertemente inmunorreactiva. c. Tegmentum (Tg) mesencefálico con una ligera densidad de FIR (↑) . d. Aumento mayor de esa misma zona con FIR (↑).

Inmunorreactividad a ME. e. Se observa en el tracto tecto-cerebeloso una ligera densidad de FIR (↑) . f. Tegmentum istmico (TgI) con una NIR (^) ligeramente inmunorreactiva. g. Un mayor aumento (400x) de esta neurona. h. FIR (↑) (++) en el tegmentum dorsal (TgD). i. Se observa a mayor aumento esas FIR (↑).

Cortes. Coronales: a,b,c,d,f,g,h,i; parasagitales: e. Aumentos: 100x= a,c,e,f,h; 250x= d,i; 400x= b,g. Densidad de FIR, += escasa, ++= ligera, +++= densa, y ++++= muy densa. Todos los cortes tienen un espesor de 12-15 µm.



Rombencefalo:

La médula oblongada, presentó en sus tres zonas: sensorial (ZS), formación reticular (FR) y motora (ZM) NIR y FIR tanto para LE como para ME. En el límite de la Formación reticular y la zona motora a nivel del núcleo del VII nervio craneal en la zona del fascículo solitario (FS), se encontraron grupos de NIR a LE de 1-5 por corte (Fig. 11a, c) y FIR (++) distribuidas en toda la substancia blanca de la zona motora a nivel del fascículo longitudinal medial (FLM) del rombencefalo (Fig. 11 b, d). La zona sensorial presentó una escasa densidad de FIR.

La distribución de NIR y FIR para ME es similar a la de LE (Fig. 11 e, f, g, h).

En la tabla VI se resume de manera general los resultados obtenidos de la distribución de NIR y FIR a LE y ME en las diferentes regiones cerebrales, y en las Figuras 12, 13 y 14 se marcan los sitios donde se localizan neuronas y fibras IR a ambos péptidos dentro del sistema nervioso central del axolotl.

Figura 11. Fotomicrografías del rombencéfalo del axolotl, *Ambystoma mexicanum*, donde se muestran las neuronas y las fibras inmunorreactivas (NIR y FIR) a LE y ME.

Inmunorreactividad a LE: a. Se observan NIR (^) en los núcleos grises del fascículo solitario (Fs) y FIR (↑) (+++) en la parte ventral de esta estructura, b. FIR (↑) (+++) en la parte ventral del rombencéfalo, c. Una NIR en el fascículo solitario (Fs).

Inmunorreactividad a ME, d. Parte ventral del rombencéfalo con FIR (↑), e. Fascículo solitario (Fs) con neuronas (^) y fibras (↑) inmunorreactivas cerca del núcleo reticular medio (CRM), f. Esas mismas NIR (^) a un mayor aumento, g. FIR (↑) y NIR (^) en el fascículo solitario (Fs), h. Estas mismas neuronas a un mayor aumento (^).

Cortes. Coronales: c,e,f,g,h ; transversales: a,b ; parasagittales: d, c. Aumentos: 100x= a,b,e,g ; 250x= f,h ; 400x= c,d. Densidad de las FIR, += escasa, ++= ligera, +++= densa, y ++++= muy densa. Todos los cortes tienen un espesor de 12-15µm.

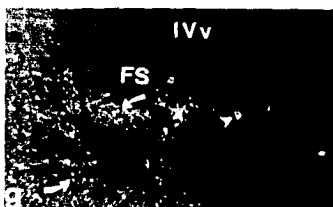
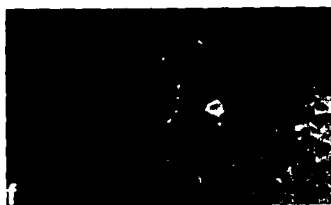
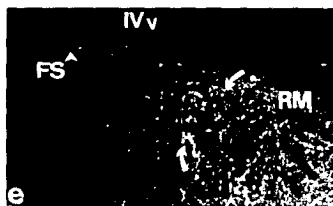
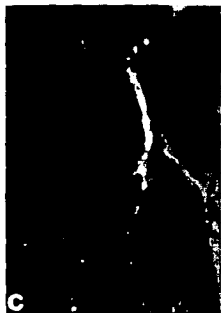
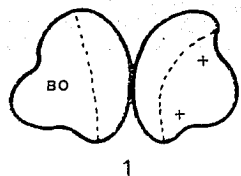


TABLA VI. DISTRIBUCION DE NEURONAS Y FIBRAS INMUNORREACTIVAS A LE Y ME EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL AXOLOTL (*Ambystoma mexicanum*).

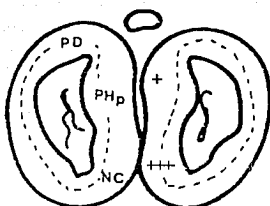
Estructuras	LE		ME	
	NIR	FIR	NIR	FIR
TELENCEFALO				
Bulbo olfatorio	0	++	0	+
Palio dorsal	0	+	0	+
Palio piriforme	0	+	0	+
Palio hipocampal	*	++	*	+++
Núcleos septales	*	+++	*	+++
Núcleo acumbens	0	+++	0	+++
Cuerpo estriado	0	+++	0	+++
Núcleo amigdalino	0	++++	0	++++
Núcleo caudado	0	++++	0	++++
Comisura anterior	*	+++	*	+++
Comisura hipocampal	*	+++	*	+++
Tractos ventrales	0	+++	0	+++
DIENCEFALO				
Núcleos habenuares	0	+++	0	+++
Núcleo preoptico	▲	++++	▲	++++
Núcleos talámicos	▲	++++	▲	++++
Núcleos hipotalámicos	■	++++	■	++++
MESENFALO				
Tectum	*	++	*	++
Tegmentum	*	++	*	++
Istmo	0	++	0	++
Cerebelo	0	+	0	+
ROMBENCEFALO				
Médula oblongada				
Zona sensorial	0	+	0	+
Formación reticular	*	++	*	++
Zona motora	*	+++	*	+++

Notaciones: Neuronas inmunorreactivas (NIR) , 0 = cero neuronas por corte, * = de 1-5 , ▲ = 5-10, ■ = 10 o más neuronas. Fibras inmunorreactivas (FIR) . Densidad; escasa (+), ligera (++) , densa (+++) , y muy densa (++++).

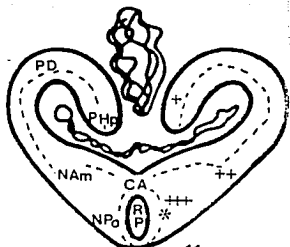
Figura 12. Esquemas de cortes coronales del cerebro del axolotl, *Ambystoma mexicanum*, donde se muestra la distribución de las neuronas y fibras inmunorreactivas (NIR, FIR) a LE y ME. La localización de las NIR se representa en el lado derecho de cada esquema con *: 1-5 neuronas, ▲: 5-10 neuronas, ■: 10 ó más neuronas y la densidad de las FIR por +: escasa, ++: ligera, +++: densa y ++++: muy densa. Los esquemas del 1 al 12 muestran el telencéfalo, del 13 al 17 el diencefalo, del 18 al 25 el mesencéfalo y del 26 al 27 el rombencéfalo. La línea discontinua representa el límite entre la sustancia blanca y la sustancia gris.



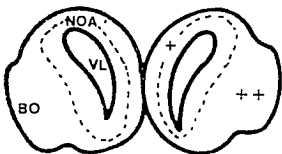
1



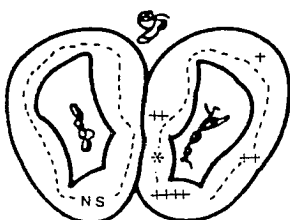
6



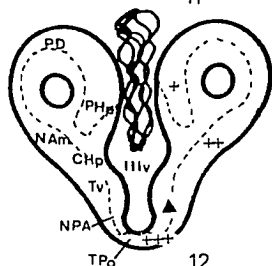
11



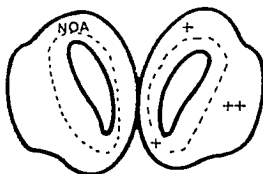
2



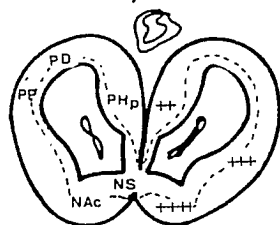
7



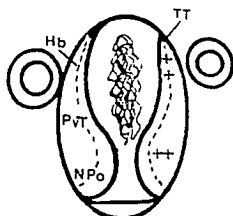
12



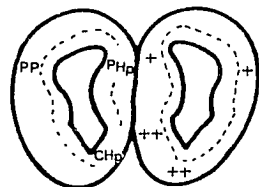
3



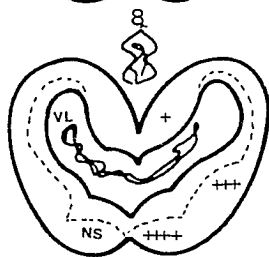
8



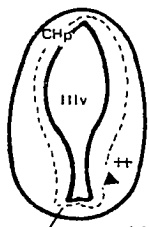
13



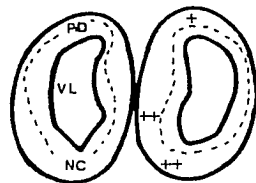
4



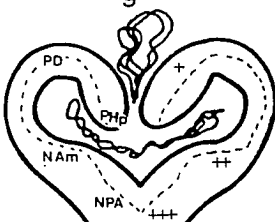
9



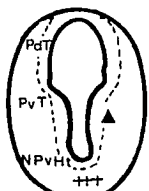
14



5

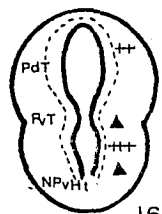


10

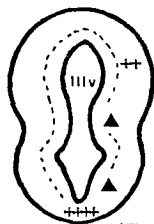


15

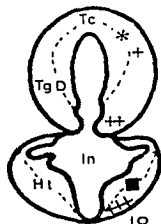
1 mm



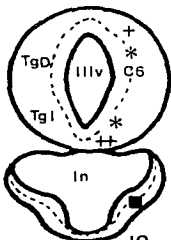
16



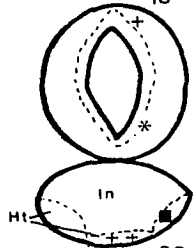
17



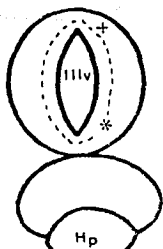
18



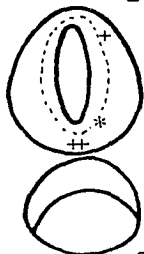
19



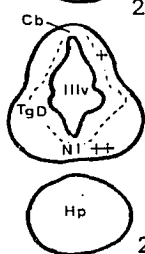
20



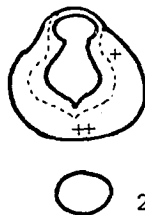
21



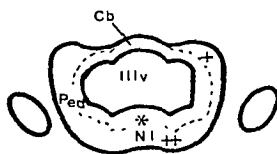
22



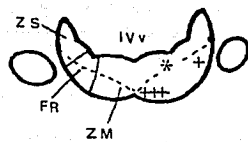
23



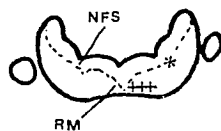
24



25

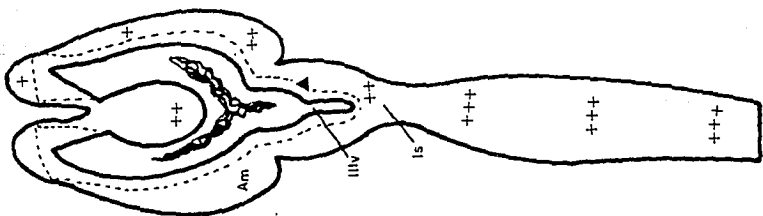


26

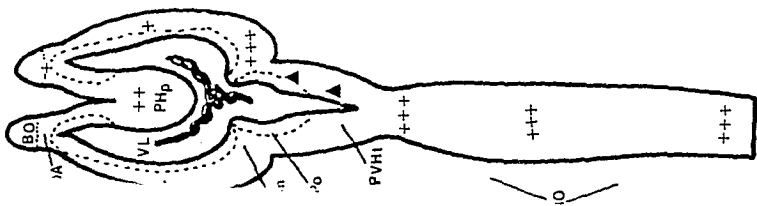


27

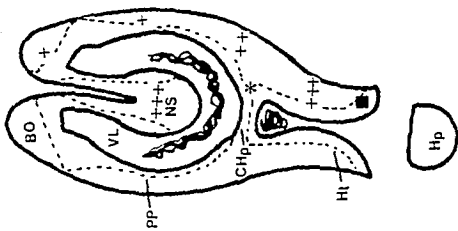
1mm



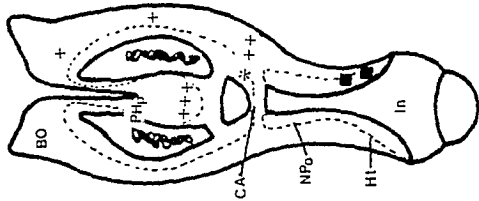
7



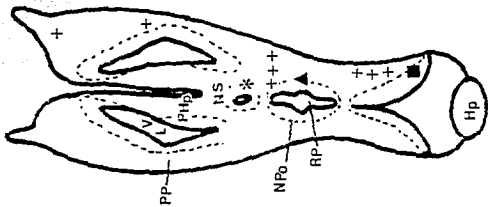
6



8



9



10

1mm

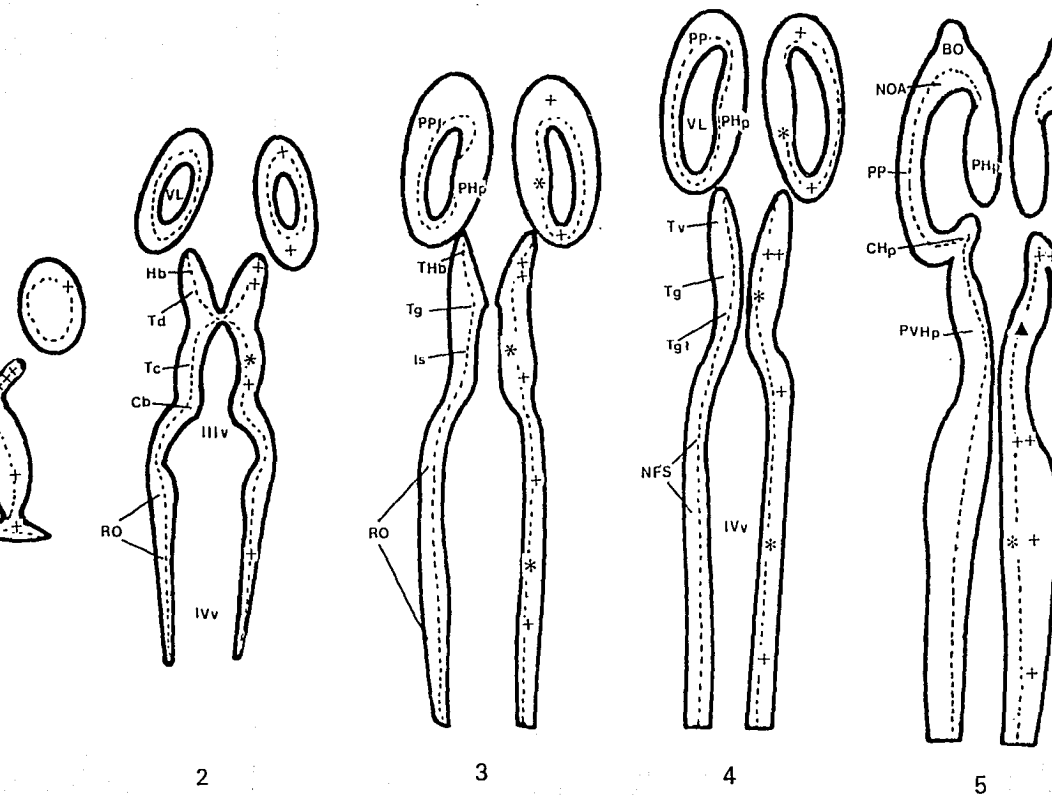


Figura 13. Esquemas de cortes transversales del cerebro del axolotl, *Anbystron mexicanum*, donde se muestra la distribución de neuronas y fibras inmunorreactivas (NIR, FIR) a LE y ME. La localización de las NIR se representa con *: 1-5 neuronas, ▲: 5-10 neuronas, ■: 10 o más neuronas, y la densidad de las FIR por +: escasa, ++: ligera, +++: densa, y ++++: muy densa. La línea discontinua representa el límite entre la sustancia blanca y la sustancia gris.

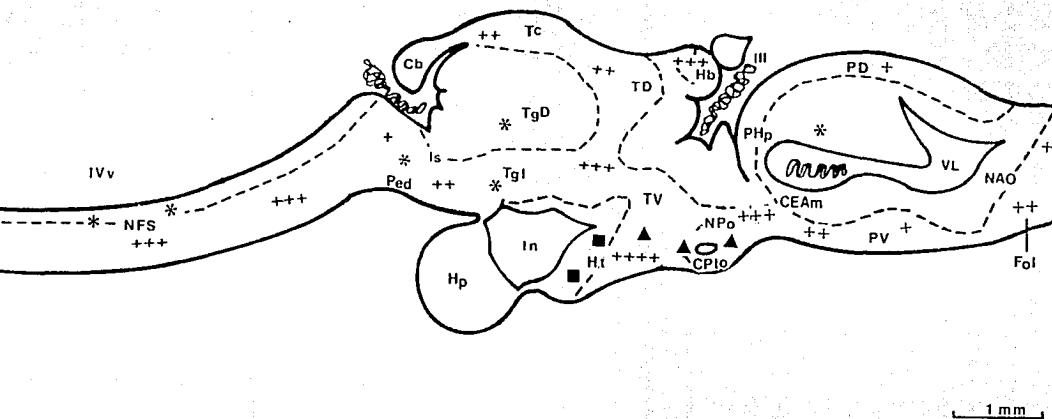


Figura 14. Esquema de un corte parasagital del cerebro del axolotl, *Ambystoma mexicanum*, donde se muestra la distribución de las neuronas y fibras inmunorreactivas (NIR, FIR) a LE y ME. Las NIR se representan con *: 1-5 neuronas, ▲: 5-10 neuronas, ■: 10 ó más neuronas, y la densidad y localización de las FIR por +: escasa, ++: ligera, +++: densa y ++++: muy densa. La línea discontinua representa el límite entre la sustancia blanca y la sustancia gris.

DISCUSION

Los estudios histológicos se realizaron con el fin de comparar, identificar y localizar los diferentes núcleos y estructuras cerebrales del axolotl (Ambystoma mexicanum), con los trabajos de Judson Herrick (1917; 1948), hechos en Necturus maculosus y en Ambystoma tigrinum. Esta comparación mostró que en las series procesadas con diferentes técnicas de tinción en el SNC del A. mexicanum, existe una similitud anatómica entre las estructuras cerebrales del Necturus y las del A. tigrinum, lo cual nos permitió utilizar dichos trabajos como referencia, que aunados con los nuestros, facilitaron el análisis de los resultados inmunohistoquímicos.

Los resultados inmunohistoquímicos muestran la existencia y localización anatómica de los péptidos opioides Leu- y Met-enkefalinas (LE y ME) en el sistema nervioso central del axolotl (Ambystoma mexicanum). Así como las características de las neuronas que contienen LE y ME en cada una de las estructuras cerebrales.

La distribución anatómica de LE y ME en el SNC del axolotl, es muy amplia. Esta se presentó de forma similar a la descrita en los vertebrados superiores (De Lanerolle y col., 1981; Naik y col., 1981; Petrusz y col., 1985; Merchenthaler y col., 1986).

La inmunoreactividad (IR) a LE y a ME tiene una distribución paralela en el SNC del A. mexicanum, presentándose en los mismos núcleos cerebrales. Se ha descrito este hecho en el cerebro de rata y

se atribuye a que tanto LE como ME derivan de un mismo precursor: la proencefalina. Es por esto que puedan tener la misma localización regional (Elde y col., 1976; Petrusz y col., 1985). Sin embargo, no se ha demostrado coexistencia de LE y ME en la misma neurona, lo que nos habla de procesamientos proteolíticos diferentes. En nuestros experimentos seriados no encontramos coexistencia de ambos péptidos, por lo que se tienen que realizar experimentos de doble marcaje con el fin de comprobar su coexistencia.

En el caso de los anfibios, en el Xenopus laevis (Martens y Herbert, 1984; Wong y col., 1991) se ha caracterizado el gen que codifica para la proencefalina. Este contiene 7 secuencias de ME y ninguna de LE, la secuencia de la LE está reemplazada por una ME. Hay evidencias en otros anfibios anuros en donde sucede lo mismo, por lo que se ha propuesto que la organización de la proencefalina en el Xenopus es representativa del grupo de los anuros y que la LE que se encuentra en estas especies proviene de la prodinorfina (Merchenthaler y col., 1987) como sucede en el núcleo negro de la rata (Zamir y col., 1984). Esto mismo puede suceder en el axolotl.

La IR de las neuronas en cada una de las estructuras cerebrales, se distribuyó de manera homogénea en el citoplasma del soma neuronal y fibras (fig.9d). El núcleo de las neuronas no tiene inmunorreactividad.

La distribución de LE y ME en los bulbos olfatorios y telencéfalo es similar a la encontrada en otros vertebrados. Dicha distribución coincidió con la descrita en otros anfibios (Merchenthaler y col., 1989; Doerr-Schott y col., 1981). Sin embargo, el axolotl presentó diferencias en el número de NIR en estas regiones. La mayor concentración de FIR se localizó en la parte ventromedial dentro de los núcleos septales, en el núcleo amigdalino y el núcleo

caudado. La densidad de estas fibras, en las zonas mencionadas, se incrementa hacia la región caudal.

La distribución de neuronas y fibras inmunorreactivas a LE y ME en el telencefalo de mamíferos, aves y reptiles se concentra en la pared ventrolateral del telencefalo (De Lanerolle y col., 1981; Naik y col., 1981; Brauth, 1984; Reiner y col., 1984; Petrusz y col., 1985; Reiner, 1987). Esta área en anfibios y peces incluye los homólogos de los ganglios basales y el complejo amigdalino. Una segunda región del telencefalo basal que contiene un gran número de neuronas, fibras y terminales nerviosas inmunorreactivas a encefalinas es la región septal y el núcleo acumbens presente en mamíferos (Khachaturian y col., 1983; Petrusz y col., 1985; Merchenthaler y col., 1986), aves (De Lanerolle y col., 1981 y Reiner y col., 1984) y reptiles (Naik y col., 1981; Brauth, 1984; Reiner y col., 1987). En la rana (Merchenthaler y col., 1989), el estriado contiene una densa red de fibras y terminales nerviosas inmunorreactivas y únicamente pocas NIR. Un número considerable de NIR y FIR también se reportan en el núcleo septal medial y la amígdala medial de la rana. Un modelo similar de inmunorreactividad a encefalinas fue descrito en el telencéfalo basal del pez pulmonado Protopterus annectens (Reiner y Northcutt, 1987).

El diencéfalo es la estructura cerebral donde se encontró un mayor número de neuronas y fibras IR para ambos péptidos. En el núcleo preóptico, núcleos talámicos y principalmente en los núcleos hipotalámicos (fig. 9c.g.1), además de una alta densidad de FIR en cada uno de estos núcleos. El patrón de distribución de la IR que presentó el diencéfalo del axolotl fue similar al reportado en vertebrados superiores (De Lanerolle y col., 1981; Petrusz y col., 1985; Reiner y col., 1984). El hipotálamo del axolotl, contienen un gran número de NIR y FIR. En esta estructura, se observaron neuronas en la pared

infundibular con sus terminales dirigidas hacia el infundíbulo como si liberaran su contenido hacia el (fig.9h.1). Esto sugiere que las encefalinas actúan sobre una célula blanco a distancia, es decir, de tipo hormonal, como se ha propuesto en otros vertebrados (Rossier y col., 1979; Reiner y Northcutt, 1987; Merchenthaler y col., 1989; Naik y col., 1981). Otras neuronas de este grupo envían sus terminales hacia la parte ventral hipotálamica en donde la liberación de estos péptidos probablemente sea la clásica, es decir, en la sinapsis.

En el mesencéfalo, el axolotl presentó pocas neuronas y fibras inmunorreactivas. En el tectum las NIR se localizaron en las capas 6 y 7, mientras que las NIR en tegmentum se encontraron en la parte istmica. La distribución de la inmunorreactividad a encefalinas en el axolotl fue similar a la descrita en el tectum de la Rana esculenta y de los reptiles (Naik y col., 1981; Merchenthaler y col., 1989). En el tectum de rana (Rana esculenta) las NIR se localizan en la capa 6 del tectum óptico, las FIR se ubican en la lámina F y en las capas 7, 5 y 3 formando bandas fuertemente inmunorreactivas, con mayor concentración en la lámina C las cuales provienen de la proyección retinal. El origen de las FIR periventriculares se desconoce, pero probablemente se originan de las neuronas encefalinérgicas de la capa 6 del tectum (Merchenthaler y col., 1989). En las tortugas (Pseudemys scripta y Chrysemys dicta), las NIR se distribuyen en la zona gris periventricular, con tres bandas de FIR intensamente marcadas en la porción tegmental, área periventricular y pretectal (Reiner, 1987). En el lagarto (Anolis carolinensis), dentro del estrato gris central (lámina 7) se han identificado NIR y FIR en el gris central alrededor del acueducto, torus semicircularis, núcleo trigeminal mesencefálico y en el núcleo intercolicular (Naik y col., 1981). Por otro lado, en las aves las NIR están en las capas 8-10 del

tectum óptico. Estas células IR se localizan cerca de la superficie del tectum. Las aves presentan bandas de FIR similares a las observadas en la tortuga, excepto en la capa 14 de la región periventricular. Muchas de las fibras inmunorreactivas a proencefalina en las capas 8-13 del diencefalo parecen originarse de las neuronas del núcleo espiriforme lateral (Reiner y col., 1982). Mientras que en el pollo doméstico, las NIR se localizan en el núcleo intercolicular, y el núcleo mesencefálico lateral, y las FIR en el área gris central periacueductal, y el área C. Los mamíferos presentan NIR en el núcleo interpeduncular, la sustancia negra, el área tegmental ventral, el área gris periacueductal y el colículo superior (Khachaturian y col., 1983; Petrusz y col., 1985).

En el rombencéfalo de axolotl, la medula oblongada en sus tres zonas (sensorial, formación reticular y motora) presentó neuronas y fibras inmunorreactivas para LE y ME. Entre la formación reticular y la zona sensorial (fig. 11a,e) se encontró una mayor cantidad de NIR (1-5 neuronas por corte) a nivel del núcleo motor superior del trigémino (núc. m. V). La zona motora presentó una ligera densidad de FIR dentro del fascículo longitudinal. En la rana, la tortuga y el lagarto la distribución de neuronas y fibras IR presentan una distribución semejante a la del axolotl (Merchanthaler y col., 1989; Reiner, 1987; Naik y col., 1981).

El rombencéfalo de los mamíferos y los reptiles contienen neuronas y fibras encefalinérgicas, localizadas en los núcleos del tracto solitario. El núcleo del rafe, locus ceruleus, y el núcleo caudalis de estos vertebrados contienen NIR, además de presentar una red densa de FIR a encefalinas en el mielencéfalo caudolateral. El origen de estas FIR en mamíferos es de las neuronas IR de los mismos núcleos (Petrusz y col., 1985; Merchanthaler y col., 1986; Reiner,

1987). Mientras que en las aves únicamente se han detectado FIR en esta zona y en el tracto solitario (De Lanerolle y col., 1981). En ninguna estructura homóloga a estos núcleos en la rana se han detectado encefalinas. Sin embargo, las únicas áreas del rombencéfalo que contienen NIR son la región del obex y el núcleo del tracto solitario, probablemente son las que más proveen de FIR al tallo cerebral inferior provenientes de las neuronas localizadas en el área más rostral de esta estructura (Merchenthaler y col., 1989). Un modelo similar de distribución de FIR se reporta en el mielencéfalo de dos especies de teleosteos (Finger, 1981).

Asai y col. (1988) en un estudio realizado en el A. mexicanum, demuestran por medio de radioinmunoanálisis, la existencia de inmunorreactividad a encefalinas en las diferentes estructuras cerebrales. Nuestros resultados coinciden en cuanto a que la concentración de encefalinas es mayor en el diencéfalo y con niveles más altos para ME.

Nuestros resultados y los de los estudios mencionados anteriormente demuestran que las encefalinas están distribuidas en las mismas regiones y núcleos en el SNC de los diferentes vertebrados de la escala filogenética lo que sugiere su participación en funciones similares y filogenéticamente relevantes.

CONCLUSIONES

1. La neuroanatomía del A. mexicanum y del A. tigrinum es semejante.
2. El Ambystoma mexicanum presenta una amplia distribución de LE y ME en el sistema nervioso central.
3. La distribución anatómica de los péptidos opioides LE y ME en el sistema nervioso central del Ambystoma mexicanum es similar a la reportada en otros vertebrados incluyendo mamíferos.
4. La IR a LE y ME se encuentra en las mismas regiones cerebrales. Sin embargo no se encontró coexistencia de estos péptidos en las mismas neuronas.
5. La IR a LE y ME se encuentra distribuida homogéneamente en el citoplasma de las neuronas.
6. La distribución anatómica de estos péptidos opioides sugiere la posibilidad de la modulación sensorial e inclusive motora ejercida por estos péptidos, como ocurre en los vertebrados superiores.
7. La localización de las fibras y neuronas inmunorreactivas a estos péptidos opioides tienen una distribución similar en el SNC de los diferentes vertebrados de la escala filogenética, lo que sugiere que las encefalinas tengan funciones similares y filogenéticamente relevantes.

ANEXOS

a) Técnica de Hematoxilina-Eosina.

Esta tinción es la más utilizada en los estudios histológicos, con la cual podemos observar los núcleos de las células (en azul) y el citoplasma (en rosa). El procesamiento utilizado fue el siguiente:

- Colocar los cortes desparafinados e hidratados en Hematoxilina de Harris durante 20 min.
- Lavar con agua corriente por 3 min.
- Sumergir en alcohol ácido 3 veces.
- Lavar con agua corriente 1 min.
- Sumergir en LiHCO_3 al 0.95% 5 veces.
- Lavar con agua corriente durante 10 min.
- Colocar en eosina acuosa durante 2 min.
- Deshidratar en alcohol al 96% (2 cambios de 2 min). para remover el exceso de eosina, y posteriormente en alcohol absoluto (2 cambios de 5 min).
- Aclarar en xilol (2 cambios de 5 min).
- Finalmente cubrir los cortes con resina sintética.

b) Tinción rápida de Nissl

Esta técnica es ampliamente utilizada en la neurohistología, la cual se utiliza para observar los núcleos de las células. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- Colocar los tejidos desparafinados e hidratados en una solución de violeta de cresilo durante 10 min.

- Sumergir 3 veces en solución buffer y después en alcohol al 70%.
- Deshidratar en concentraciones ascendentes de alcohol empezando por alcohol al 70% y 100% 3 cambios en cada alcohol por 10 minutos.
- Aclarar en xilol (2 cambios por min).
- Cubrir los cortes con resina sintética.

c) Metodo de Bodian

Esta técnica es utilizada en neurohistología para teñir fibras y terminales nerviosas. en la cual observaremos las fibras nerviosas (en negro), el fondo (en azul) y los núcleos de las neuronas (en negro). El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- Colocar los cortes desparafinados e hidratados en una solución de protargol al 1% y adicionar 6 gramos de cobre limpio por cada 100 ml de solución durante 48 hrs a 37 °C.
- Lavar en agua destilada (3 cambios).
- Sumergir en solución reductora (hidroquinona al 1%) por 10 min.
- Lavar en agua destilada (3 cambios).
- Virar con una solución de cloruro de oro al 1% por 10 min.
- Lavar en agua destilada (3 cambios).
- Revelar en una solución de ácido oxálico al 2% aproximadamente 3 min.
- Lavar en agua destilada (3 cambios).
- Colocar en una solución de tiosulfato de sodio al 5% por 5 min.
- Contrateñir con una solución azul de anilina 5 min.
- Deshidratar en alcohol al 96%, alcohol absoluto. aclarar con xilol (2 cambios cada uno).

-Montar con resina sintética.

d) Metodo de Kluver-Barrera:

Esta tincion es utilizada en neuronistologia para observar fibras mielinizadas y bulvas nerviosas. El procedimiento a utilizar fue el siguiente:

-Colocar los cortes desparafinados e hidratados en una solucion de luxol rapido a 56°C durante 8 hrs.

-Lavar en alcohol al 96%.

-Diferenciar en una solucion de carbonato de litio al 0.02%.

-Diferenciar en alcohol al 70%.

-Lavar en agua destilada.

-Diferenciar en una solucion de carbonato de litio y poner en varios cambios de alcohol al 70%.

-Lavar en agua destilada.

-Colocar en una solucion de violeta de cresilo durante 6 min a 57°C.

-Diferenciar en varios cambios de alcohol al 96%

-Deshidratar en alcohol absoluto, y aclarar en xilol. (2 cambios en cada uno).

-Cubrir con resina sintetica.

BIBLIOGRAFIA

1. Akil H, Mayer D, Liebeskind J: Antagonism of stimulation produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*. 191: 961-962, 1976.
2. Akil H, Watson S J, Young E, Lewis J E, Wagnatourian H, Walker M: Endogenous opioids: Biology and function. *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 223-255, 1984.
3. Asai M, Cano A, Talavera E, Zubieta M: IR-MET and IR-LEU enkephalin content in the Axolotl brain (Ambystoma mexicanum). *Neuropeptides*. 12: 41-42, 1988.
4. Bayon A, Rossier J, Mauss A, Bloom F E, Iversen L, Ling N, Guillemin R: In vitro release (5-methionine) enkephalin and (5-leucine) enkephalin from the rat globus pallidus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 3503-3506, 1978.
5. Bayon A, Koda L, Battenberg E, Adar R, Bloom F: Regional distribution of endorphin, met-enkephalin and leu-enkephalin in the pigeon brain. *Neurosci. Lett.* 18: 75-80, 1980a.
6. Bayon A, Koda L, Battenberg E, Bloom F E: Redistribution of endorphin and enkephalin immunoreactivity in the rat brain and pituitary after in vivo treatment with naloxone or cytochalasin B. *Brain Res.* 183: 103-111, 1980b.
7. Bloom F, Battenberg E, Rossier J, Ling J L, Leppaluoto J, Vargo T M, Guillemin R: Endorphins are located in the intermediate and anterior lobes of the pituitary gland, not in the neurohypophysis. *Life Sci.* 20: 43-48, 1977.
8. Bloom F E, Battenberg E, Rossier J, Ling N, Guillemin R: Neurons containing B-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: Immunocytochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 1591-1595, 1978.
9. Bonnet K A, Grotin J, Giomann T, Cortes M, Simon E J: Opiate receptor heterogeneity in human brain regions. *Brain Res.* 221: 437-440, 1981.
10. Bradbury A F, Feldberg W F, Smyth D G, Snell C: Lipotropin C fragment an endogenous peptide with potent analgesic activity. En: Kosterlitz, H. W (Ed), *Opiates and endogenous opioid peptides*. Elsevier, Amsterdam, 9-17, 1976.
11. Brandon R A: Natural history of axolotl and its relationships to other ambystomatid salamanders. En: Armstrong J B, Malacinski G: *Developmental biology of the axolotl*. Oxford University Press, Nueva York, pp. 3-12, 1989.
12. Brauth S: Enkephalin-like immunoreactivity within the telencephalon of the reptile Caiman crocodilus. *Neuroscience*. 11 (2): 345-358, 1984.

13. Buatti M, Pasternak G: Multiple opiate receptors: phylogenetic differences. *Brain Res.* 1919: 400-405. 1981.
14. Buckingham J T, Cooper T A: Differences in hypothalamo-pituitary adrenocortical activity in the rat after acute and prolonged treatment with morphine. *Neuroendocrinology*. 38: 411-417. 1984.
15. Chang K J, Cooper B R, Razum E, Cuatrecasas P: Multiple opiate receptors: Different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. *Mol. Pharmacol.* 16: 91-104. 1979a.
16. Chang K J, Cuatrecasas P: Multiple opiate receptors. *J. Biol. Chem.* 254:2610-2616. 1979b.
17. Chang W L, Garner H, Russell J, Loh Y: Proopiomelanocortin-converting enzyme activity in bovine neurosecretory granules. *Endocrinology*. 111: 1607-1614. 1982.
18. Colt E W D, Wardlaw S L, Frantz A G: The effect of running on plasma β -endorphin. *Life Sci.* 29:1637-1640. 1981.
19. Comb M, Seeburg P H, Adelman J, Eiden L, Heberl E: Primary structure of the human met- and leu- enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*. 295:663-664. 1982.
20. Cone C, Goldstein A: A dynorphin-like opioid in the central nervous system of an amphibian. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3345-3349. 1982.
21. De Lanerolle N C, Elde R P, Sparber S B, Frick M: Distribution of methionine-enkephalin immunoreactivity in the chick brain: An immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 199:513-533. 1981.
22. Devigne P, Moore F L: Biochemical characterization and a urodele distribution of 3 H-naloxone binding sites in a urodele amphibian. *Soc. Neurosci. Abs.* 9:2:4:981. 1989.
23. Doerr-Schott J, Dubois M P, Linchte L C: Immunohistochemical localization of substances reactive to antisera against α - and β -endorphin and Met-enkephalin in the brain of Rana temporaria L. *Cell. Tissue Res.* 217:79-92. 1981.
24. Dores R M, Surprenant A: Biosynthesis of multiple forms of beta-endorphin in the reptiles intermediate pituitary. *Peptides* 4:889-896. 1984.
25. Dores R M, Khachaturian H, Watson S J, Akil H: Localization of neurons containing pro-opiomelanocortin-related peptides in the hypothalamus and midbrain of the lizard, Anolis carolinensis: evidence for region specific processing of beta-endorphin. *Brain Res.* 324:384-389. 1984a.
26. Dores R M, Finger T, Gold M: Immunohistochemical localization of enkephalin and ACTH-related substances in the pituitary of the lamprey. *Cell Tissue Res.* 235:107-115. 1984b.

15. Doros R M., Rothenberg M E: Isolation of Immunoreactive β -Endorphin-Related Peptides From the Posterior Pituitary of the Amphibian, Xenopus laevis. Peptides, 8: 1119-1125, 1987.
17. Doros R M., Gorbman A: Detection of Met-enkephalin and Leu-enkephalin in the brain of the hagfish Eptatretus oregoni and the lamprey Petromyzon marinus. Gen. Comp. Endocrinol., 77:429-439, 1990.
18. Elde R., Hökfelt T., Jonasson O., Terenius L: Immunohistochemical studies using antibodies to leucine-enkephalin: Initial observations on the nervous system of the rat. Neuroscience, 5:349-351, 1976.
29. Finger T E: Enkephalin-like immunoreactivity in the gustatory lobe and visceral nuclei in the brains of goldfish and catfish. Neuroscience, 4:2447-2458, 1981.
30. Fischli W., Goldstein A., Hunkapiller M., Hood L: Isolation and amino acid sequence analysis of a 4,000 dalton dynorphin from porcine pituitary. Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 5435-5437, 1982.
31. Franker L., Snyder S: Purification and characterization of enkephalin-convertase an enkephalin-synthesizing carboxypeptidase. J. Biol. Chem., 258: 10950-10955, 1983.
32. Goldsmith M A., Sei C A., Lance V., Doros R M: Detection of prodynorphin and products in lizard, turtle, and alligator brain extracts. Peptides, 13:435-440, 1992.
33. Goldstein A., Lowney I., Palk: Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener, levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 1742-1747, 1971.
34. Graf L., Kenessey A., Patty A., Grynbaum A., Marks N., Lajtha A: Cathepsin D. Generates gamma endorphin from beta-endorphin. Arch. Biochem. Biophys., 193:101-109, 1979.
35. Gubler U., Seeburg P., Hoffman B J., Gage L P., Udenfriend S: Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. Nature, 295:206-208, 1982.
36. Guillemin R., Ling N., Burges R: Endorphins, peptides d'origine hypothalamique et neurohypophysaire d'activite morphinomimetique. Isolement et structure moleculaire d'alpha-endorphin. C.R. Acad. Sci., Ser. D., 282:783-785, 1976.
36. Gustafsson M K S., Lohtonen M A E., Sundler F: Immunocytochemical evidence for the presence of "mammalian" neurohormonal peptides in neurones of the tape worm Diphyllobothrium dendriticum. Cell Tissue Res., 243:41-49, 1986.
37. Hanson M., Edström A: Fast axonal transport: effect of antimitotic drugs and inhibitors of energy metabolism on the rate and amount of transported protein in frog sciatic nerves. J. Neurobiol., 8:97-108, 1977.

38. Herrick J C: The internal structure of the midbrain and thalamus of Necturus. J. Comp. Neurol., 28:215-348, 1917.
39. Herrick J C: The brain of the tiger salamander, Ambystoma tigrinum. The University of Chicago and London, Press:1948.
40. Holaday J W, Lon H H: Neurobiology of beta-endorphin and related peptides. En: Li CH (Ed), Hormonal Proteins and Peptides. Academic Press, New York, 102-291, 1981.
41. Holaday J W, Porreca S, Rothman R: Opioid receptor type. TIPS, 1989.
42. Hughes J: Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. Brain Res., 88: 295-308, 1975.
43. Hughes J, Smith T, Kosterlitz H, Fothergill L, Morgan B, Morris H: Identification of two related peptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature, 255: 577-579, 1975.
44. Iversen L, Iversen S, Bloom F, Vargo T, Guillemin R: Release of enkephalin from rat globus pallidus in vitro. Nature, 27E: 679-687, 1978.
45. Josefsson J O, Johansson P: Naloxone-reversible effects of opioids on pinocytosis in Ampoeba proteus. Nature, 282: 78-80, 1979.
46. Kandel R, Schwartz H J, Jessell M: Principles of neurosciences. Elsevier, 3th edition, USA, pp. 214-215.
47. Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda H, Marimato Y, Hirose T, Asai M, et al: Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine B-neoendorphin/dynorphin precursor. Nature, 298:245-249, 1982.
48. Kavaliers M, Hirst M, Teskey G C: Opioid systems and feeding in the slug Limax maximus similarities to and implications for mammalian feeding. Brain Res. Bull., 14:681-685, 1985.
49. Kavaliers M, Hirst M: Naloxone-reversible stress-induced feeding and analgesia in the slug Limax maximus. Life Sci., 38: 203-209, 1986.
50. Kawauchi H, Tsubokawa M, Kenezewa A, Kitagawa H: Occurrence of two different endorphins in the salmon pituitary. Biochem. Biophys. Commun., 92:1278-1288, 1980.
51. Khachaturian H, Watson S J, Lewis M E, Coy D, Goldstein A: Dynorphin immunocytochemistry in the rat central nervous system. Peptides, 3: 941-954, 1982.
52. Khachaturian H, Lewis M E, Hollt U, Watson S J: Telencephalic enkephalinergic systems of the rat. J Neurosci., 3:844-855, 1983.
53. Khachaturian H, Lewis E, Schafer K H, Watson S: Anatomy of the CNS opioid systems. Trends Nerv. Sys., 1: 111-118, 1985.
54. Kilpatrick D, Wahlstrom A, Lahm H M, Blacher R, Udenfriend S: Rimorphin, a unique, naturally occurring (Leu) enkephalin-containing

- peptide found in association with dinorphin and alpha-neo-dinorphin. Proc. Natl. Acad. Sci., 79:6480-6483, 1982.
55. Kilpatrick D, Howells R, Lahm H M, Udenfriend S: Evidence for a proenkephalin-like precursor in amphibian brain. Proc. Natl. Acad. Sci., 80:7772-7775, 1983.
 56. Kosterlitz H: Possible physiological significance of multiple endogenous opioid agonists. En: R F Ber, E G Basset (Eds). Mechanisms of pain and analgesic compound. Raven Press, N. Y., 207-214, 1979.
 57. Leboulenger F, Charnay Y, Dubois P, Rossier J, Vandry H: Presence of proenkephalin in chromaffin cells of the frog adrenal gland. Neurochem. Int., 6: 773-777, 1984.
 58. Leon-Olea M, Sanchez-Alvarez M, Briones M, Martinez-Servin M: Existencia de inmunoreactividad a Leu-enkefalina en neuronas de caracol de jardín (Helix aspersa). Memorias del XXX Congreso Nal. de Ciencias Fisio., Jalapa, Ver., 1987.
 59. Leon-Olea M, Sanchez-Alvarez M, Piña A, Bayon A: Evidence for enkephalin- and endorphin-immunoreactivity cells in the anterior pituitary of the axolotl Ambystoma mexicanum. J. Comp. Neurol., 305:410-420, 1991.
 60. Leroith D, Liotta A, Roch J, Shiloach J, Lewis M, Pert C, Kreiger D: Coticotropin and β -endorphin like materials are native to unicellular organisms. Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 2086-2090, 1982.
 61. Leung M K, Stefano G B: Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of Mytilus edulis (Mollusca). Proc. Natl. Acad. Sci., 8E:955-958, 1984.
 62. Leung M K, Stefano G B: Comparative neurobiology of opioid invertebrates with special attention to senescent alterations. Prog. Neurobiol., 28:121-159, 1987.
 63. Lewis M E, Khachaturian H, Watson S J: Visualization of opiate receptors and opioid peptides in sequential brain sections. Life Sci., 3E: 1247-1250, 1982.
 64. Luna L G: Manual of histologic staining methods of the armed forces Institute of Pathology. 3a Edición. Mc Graw Hill, U.S.A., 1968.
 65. Manteuffel-Naujoks C, Manteuffel G, Himstedt W: Localization of motoneurons innervating the extraocular muscles in Salamandra salamandra L. (Amphibia, urodela). J. Comp. Neurol., 254:133-141, 1986.
 66. Martens G, Herbert E: Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in Xenopus laevis. Nature, 310: 251-254, 1984.
 67. Martens C, Givelli O, Herbert H E: Nucleotide sequence of cloned cDNA for proopiomelanocortin in the amphibian Xenopus laevis. J.

68. Martin W E, Eades C B, Thompson J A, Hupper R E, Gibert P E: The effects of morphine and nalorphine like drugs in the non-dependent and morphine dependent chronic spinal dog. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 197:517-532, 1976.
59. Mayer D, Lisbeskind J: Pain reduction by local electrical stimulation of the brain. An anatomical and behavioural analysis. *Brain Res.*, 68: 73-93, 1974.
70. Mendelsohn G, D'Agostino R, Eggleston J C, Baylin S B: Distribution of β -endorphin immunoreactivity in normal human pituitary. *J. Clin. Invest.*, 63:1297-1301, 1979.
71. Merchenthaler I, Maderdrut L J, Altschuler R A, Petrusz P: Immunocytochemical localization of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*, 17:335-348, 1986.
72. Merchenthaler I, Maderdrut L J, Lazar G, Gulyas J, Petrusz P: Immunocytochemical analysis of proenkephalin-derived peptides in the amphibian hypothalamus and optic tectum. *Brain Res.*, 416:219-227, 1987.
73. Merchenthaler I, Lazar G, Maderdrut L J: Distribution of proenkephalin-derived peptide in the brain of Rana esculenta. *J. Comp. Neurol.*, 281:23-39, 1989.
74. Mizuno K, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H: A new family of "big" Met-enkephalins from bovine adrenal medulla purification and structure of docosa (BAM-zzp) and eicosapeptide (BAM-zop) with very potent opiate activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 97: 1283-1290, 1980.
75. Mansour A, Khachaturian H, Lewis M E, Akil H, Watson S J: Anatomy of CNS opioid receptors. *Trens. Neurosci.*, 11:308-314, 1988.
76. Naik D R, Sar M, Stumpf W W: Immunohistochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the lizard, Anolis carolinensis. *J. Comp. Neurol.*, 198:583-601, 1981.
77. Nakanishi S, Inoue A, Kito T, Nakamura M, Chang A C, Cohen S U, Numa S: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature*, 278: 423-427, 1979.
78. Ninkovic M, Hunt S P, Emson P, Iversen L L: The distribution of multiple opiate receptors in bovine brain. *Brain Res.*, 214: 163-167, 1981.
79. Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S: Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*, 295: 202-206, 1982.
80. Nozaki M, Gorbman A: Immunoreactivity for met-enkephalin and substance P in cells of the adenohypophysis of larval and adult sea lampreys, Petromyzon marinus. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57:172-193, 1981.

1985.

81. Olson G A. Olson R D. Kastin A J: Endogenous opiates 1989. Peptides. 11:1277-1304. 1990.
82. Olson G A. Olson R D. Kastin A J: Endogenous opiates 1990. Peptides. 12:1407-1432. 1991.
83. Opdam P. Nieuwenhuys R: Topological analysis of the brain stem of the axolotl Ambystoma mexicanum. J. Comp. Neurol., 165:285-306. 1976.
84. Osborne H. Holtt U. Herz A: Potassium induced release of enkephalins from rat striatal slices. Eur. J. Pharmacol., 48: 219-221. 1978.
86. Pellicer F. Asai M. León-Olea M. Sanchez-Alvarez M: In vitro release of immunoreactivity Met- and Leu-enkephalins in whole periesophageal ganglia of Helix aspersa. Comp. Biochem. Physiol., 104C:323-325. 1993.
87. Pert C. Snyder S: Opiate receptor demonstration in nervous tissue. Science. 179: 1011-1014. 1973.
88. Pert C. Aposhian D. Snyder S: Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. Brain Res., 75:356-561. 1974.
89. Pert K A. Kuhar M J. Snyder S H: Autoradiographic localization of the opiate receptor in the opiate receptor in the rat brain. Life Sci., 16:1849-1854. 1975.
90. Pestarino M: Occurrence of Beta-endorphine like immunoreactive cells in the neural complex of a protochordate. Cell. Mol. Biol. 3E: 27-31. 1985.
91. Peset JL: Terapeutica y farmacologia en el romanticismo. En Entralgo C P: Historia de la medicina. Tomo V. Salvat Editores, España, pp. 331-332. 1973 .
92. Petrusz P. Merchenthaler I. Maderdrut J L: Distribution of enkephalin-containing neurons in the central nervous system. En Bjorklund, A and Hokfelt T Eds. Handbook of Chemical Neuroanatomy part 1. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam. pp. 273-334. 1985.
93. Pezalla P D. Seidah N G. Benjannet S. Crine P. Lis M. Chretien M: Biosynthesis of Beta-endorphin, Beta-lipotrophin and putative ACTH-LPH precursor in the frog pars intermedia. Life Sci., 23: 2281-2292. 1978.
94. Piccoli R. Melck D. Spagnuolo A. Vescia S: Endogenous opioids in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol., 80c:237-240. 1985.
95. Reaves T A Jr. Hayward: Immunocytochemical identification of enkephalinergic neurons in the hypothalamic magnocellular preoptic nucleus of goldfish. Carassius auratus. Cell Tiss. Res., 200:147-151. 1979a.

96. Reaves T A Jr. Hayward: Intracellular dye-marked enkephalin neurons in the magnocellular preoptic nucleus of the goldfish hypothalamus. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 76:6009-6011. 1979b.
97. Reiner A, Karten H J, Brecha N C: Enkephalin-mediated basal ganglia influences over the optic tectum: immunohistochemistry of the tectum and the lateral spiriform nucleus in pigeon. J. Comp. Neurol., 208:37-53. 1982.
98. Reiner A, Davis B M, Brecha N C, Karten H J: The distribution of enkephalin-like immunoreactivity in the telencephalon of the adult and developing domestic chicken. J. Comp. Neurol., 228:245-262. 1984.
99. Reiner A, Northcutt R G: An immunohistochemical study of the telencephalon of the african longfish, Protopterus annectans. J. Comp. Neurol., 256:463-481. 1987.
100. Reiner A: The distribution of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of turtles. J. Comp. Neurol., 259:65-91. 1987.
101. Rossier J, Battenberg E, Pittman Q, Bayón A, Koda L, Miller R, Guillemin R, Bloom F: Hypothalamic enkephalin neurones may regulate the neurohypophysis. Nature, 227: 653-655. 1979.
102. Rossier J, Vargo T M, Minick S, Ling N, Bloom F E, Guillemin R: Regional dissociation of β -endorphin and enkephalin content in rat brain and pituitary. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 5162-5165. 1977.
103. Ruegg U, Cuenod S, Hiller J, Cloannini T, Howells R, Simon J: Characterization and partial purification of solubilized active opiate receptor from toad brain. Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 4635-4638. 1981.
104. Rzasa P, Kavoustian U K, Prokop K E: Immunochemical evidence for met-enkephalin-like and leu-enkephalin-like peptides in tissues of the earthworm, Lombricus terrestris. Comp. Biochem. Physiol. 77c:345-350. 1984.
105. Sánchez-Alvarez M, León-Olea M, Piros E, Talavera E, Faulk K F, Evans C J: Characterization of opioid material in the periesophageal ganglia of Helix aspersa. Soc. Neurosci. Abs., 18(1):468, 1992.
106. Santoro C, Hall L M, Zukin R S: Opioid receptor subtypes in Drosophila melanogaster. Soc. Neurosci. Abs., 1E: 307. 1985.
107. Schulman J A, Finger T E, Brecha N C, Karten: Enkephalin immunoreactivity in Golgi cells and mossy fibers of mammalian, avian, amphibian and teleost cerebellum. Neuroscience, 6:2407-2416. 1981.
108. Simon J, Szucz M, Benythe S, Borsodia A, Zeman P, Wolleman M: Solubilization and characterization of opioid binding sites from frog Rana esculenta. Brain J. Neurochem., 43: 957-963. 1984.

109. Simon J. Benythe S. Borsodi A. Szucs M. Wollemann M: Separation of K- opioid receptor subtype from frog brain. FEBS., 183: 395- 397. 1985.
110. Smith M. Smith B: Analysis of the literature on the mexican axolotl. Synopsis of the herpetofauna of Mexico. Eric Lundberg. Augusta West Virginia, 1971.
111. Smith M: Discovery of the axolotl and its early history in biological research. En: Armstrong J B Malacinski G: Developmental biology of the axolotl. Oxford University Press, Nueva York, 13-22. 1989.
112. Stefano G B, Kream R M, Zukin R S: Demonstration of stereo specific opiate binding in the nervous tissue of the marine mollusc Mytilus edulis. Brain Res., 18E: 440-445. 1980.
113. Stefano G B, Scharrer B, Assanah P: Demonstration, characterization and Localization of opioid binding sites in the midgut of the insect Leucophaea maderae (Blattaria). Brain Res., 25: 205-212. 1982.
114. Steiner. Quinn S. Chan J. Marsh J. Tager: Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins. Annals N.Y. Acad. Sci., 1-16. 1980.
115. Steiner. Docherty K. Carol R: Golgi granule processing of peptide hormone and neuropeptide precursors. J. Cell. Biochem., 24: 121-130, 1984.
116. Takahashi A, Kawauchi H, Mouri T, Sasaki A: Chemical and immunological characterization of salmon endorphins. Gen. Comp. Endocrinol., 53: 381-388. 1984.
117. Terenius L. Acta Pharmacol Toxicol 32: 317-320, 1973.
118. Udenfriend S. Kilpatrick D: Biochemistry of the enkephalin-containing peptides. Arch. Bioch. and Biophys, 221:309-323. 1983.
119. Vallarino M, Delbende C, Bonel T D, Ottonello I, Vaudry H: Propiomelanocortin (POMC)-related peptides in the brain of the rainbow trout, Salmo gairdneri. Peptides, 10:1223-1230. 1989.
120. Vanable W J Jr: Benzocaine: An excellent amphibian anesthetic. Axolotl Newsletter, 14:18-21. 1985.
121. Vaudry H, Jenks B, Oberbeeke U: Biosynthesis processing and release of pro-opiomelanocortin relate peptides in the intermediate lobe of the pituitary gland of the frog Rana ridibunda. Peptides, 5: 905-912, 1984.
122. Vindrola O, Briones R, Asai M, Fernández A: Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in rat brain. Neurosci. Lett., 2E: 39-43. 1981.
123. Watson S J, Akil H: Alpha-MSH in rat brain occurrence within and outside brain beta-endorphin neurons. Brain Res., 182: 217-223, 1980.

124. Watson S J, Akil H, Sullivan S O, Barchas J D: Immunocytochemical localization of methionine-enkephalin. Preliminary observations. *Life Sci.* 26: 733-739, 1977.
125. Watson S J, Akil H, Richard III C W, Barchas J: Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature*. 275: 226-228, 1979.
126. Watson S J, Akil H, Ghazaroossian V E, Goldstein A: Dynorphin immunocytochemical localization in brain and peripheral nervous system preliminary studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 1260-1263, 1981.
127. Weber E, Roth K A, Barchas J D: Colocalization of L-neoendorphin and dynorphin immunoreactivity in hypothalamic neurons. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 103: 951-958, 1981.
128. Weichert C, Presch W: *Elementos de anatomía de los cordados*. Mc. Graw. Hill, 1981.
129. Wong M, Rius R A, Loh P Y: Characterization of Xenopus laevis proenkephalin gene. *Mol. Brain Res.* 11:197-205, 1991.
130. Yang H y t, Hexum T, Costa E: Opioids in adrenal gland. *Life Sci.* 27: 1119-1125, 1980.
131. Zakarian S, Smyth D G: Distribution of B-endorphin related peptides in rat pituitary and brain. *Biochem. J.* 202: 261-271, 1982.
132. Zamir N, Palkovits M, Weber E, Mezey E, Brownstein M J: A dynorphinergic pathway of Leu-enkephalin production in rat substantia nigra. *Nature*, 307: 643-645, 1984.
133. Zipser B, Ruff M R, Higgins W, Pert C B: Comparison of cross linked opiate receptors from rat, leech and tetrahymena. *Soc. Neurosci. Abs.* 1E: 308, 1985.