

03068



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y
DE POSGRADO**

**CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM-UAG**

**ONTOGENIA DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
DEL AXOLOTL,
Ambystoma mexicanum.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A :
EDUARDO SANCHEZ ISLAS**

ASESOR: DRA. MARTHA LEÓN OLEA

MEXICO, D. F.

1997

**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 esta 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.

Esta tesis de maestría fue realizada en el Laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica de la División de Neurociencias del Instituto Mexicano de Psiquiatría, bajo la dirección de la Doctora Martha León Olea.

Esta tesis fue parcialmente apoyada por los proyectos: de esta misma institución IMP-3000, 1183-N9203 de CONACyT y por las becas de CONACyT-89245 y complemento de DGAPA.

A mis padres
Por su apoyo y cariño

A mis hermanos

A mis sobrinos

Agradecimientos

A la Dra. Martha León Olea, por la paciencia, interés, apoyo, amistad y entusiasmo para el desarrollo de este trabajo. ¡Gracias Doc !

A los miembros del jurado por sus sugerencias y críticas que contribuyeron al enriquecimiento de esta tesis:

**Dr. Miguel Condés y Lara
Dra. Verónica Guarner Lans
Dr. Francisco Pellicer Graham
Dra. Esther R. Talavera Cuevas**

Al Dr. Miguel Condés y Lara y al Dr. Francisco Pellicer Graham por su apoyo y amistad.

Al Téc. Feliciano Camacho G. por su amistad y ayuda técnica.

A Raúl Cardoso por su trabajo de fotografía.

A mis amigas y compañeras: Marcela, Esther, Guadalupe y Sheyla. Les agradezco su apoyo, ayuda y amistad y sobre todo los momento que pasamos juntos de trabajo y convivencia. Aunque se hayan ido a Querétaro las perdono.

A mis amigos y compañeros del instituto Karina, José, Andres y Benito.

A mis amigos de juerga Oliver y Gill.

Agradezco a las autoridades del Instituto Mexicano de Psiquiatría: Dr. Ramón de la Fuente y Dr. Augusto Fernández Guardiola por las facilidades que me dieron para la realización de esta tesis.

Agradezco a la Dra. Sofía Díaz Miranda coordinadora del proyecto de Doctorado y Maestría en Ciencias Fisiológicas, Centro de Neurobiología, UNAM; por el apoyo brindado.

Participación en congresos y publicaciones

-PRESENCIA DE ENCEFALINAS EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO DEL AXOLOTL, *Ambystoma mexicanum*: ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO. Sánchez-Islas E, Sánchez-Alvarez, M. y León-Olca, M. LXXIX REUNION REGLAMENTARIA DE LA ASOCIACION DE INVESTIGACION PEDIATRICA. TEPOZOTLAN, MOR., DICIEMBRE 2-4, 1994.

-ENKEPHALINS IN THE DEVELOPING CENTRAL VERVOUS SYSTEM OF THE AXOLOTL, *Ambystoma mexicanum*. Sánchez-Islas E, Sánchez-Alvarez, M, Pellicer, F y León-Olca, M. 25Th ANNUAL MEETING SOCIETY FOR NEUROSCIENCE 1995. SAN DIEGO, CALIFORNIA. VOL. 21, PART 2. NOVEMBER 11-16, 1995.

-EXISTENCIA DE ENCEFALINAS EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL AXOLOTL (*Ambystoma mexicanum*). Sánchez-Islas E, Sánchez-Alvarez, M. y León-Olca, M. REUNION ANUAL DE ESTUDIANTES DE INVESTIGACION BIOMEDICA Y DE LA SALUD 1996. FAC. DE MEDICINA, UNAM. 24-25 DE OCTUBRE DE 1996. MEX. D. F.

ARTICULOS DE DIVULGACION CON COMITE EDITORIAL

Sánchez-Islas E, Sánchez-Alvarez, M. y León-Olca, M. **Presencia de Encefalinas en Etapas Tempranas del Desarrollo del Axolotl, *Ambystoma mexicanum*: Estudio Inmunohistoquímico.** Boletín de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. 1:9-15,

ÍNDICE

	pag.
RESUMEN.3
ABREVIATURAS.4
ANTECEDENTES.5
-Aspectos filogenéticos.7
-Péptidos opioides en anfibios.10
El axolotl, <i>Ambystoma mexicanum</i>12
Características biológicas.12
Péptidos opioides en el <i>A. mexicanum</i>13
-Ontogenia de los neuropéptidos.13
Ontogenia de los péptidos opioides (encefalinas)..16
-Papel de los péptidos opioides en el desarrollo del SNC.17
-Planteamiento del problema.20
-Hipótesis.20
OBJETIVOS.21
-Objetivo general.21
-Objetivos específicos.21
MATERIAL Y MÉTODO.22
-Ovoposición natural.22
-Ovoposición mediante estimulación hormonal y Fertilización <i>in vitro</i>22
-Experimentos de fertilización <i>in vitro</i>24
-Muestreo de los diferentes días del desarrollo.28
-Estudio histológico.29
-Estudio inmunohistoquímico.29
RESULTADOS.34
-Resultados de los experimentos de fertilización <i>in vitro</i>34
-Ovoposición natural.35
-Resultados histológico.36
-Resultados inmunohistoquímicos..36

DISCUSIÓN.80
CONCLUSIONES.89
ANEXOS.91
Anexo I.91
Anexo II.93
BIBLIOGRAFÍA.95

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pag.
INTRODUCCIÓN	
Figura 1.6
Tabla Ia8
Tabla Ib..9
Tabla II.11
Figura 2.14
Tabla III.14
Tabla IV.17
Figura 3..18
MATERIAL Y MÉTODO	
Tabla V..23
Tabla VI.24
Tabla VII.27
Figura 4..30
Tabla VIII.32
Figura 5.33
RESULTADOS	
Tabla IX.37
Tabla X.38
Figura 6.40
Tabla XI.49
Figura 7.50
Figura 8.65
Figura 9.68
Figura 10.71
Figura 11.74
Tabla XII.77
Tabla XIII.78
Tabla XIV.79

RESUMEN

Se ha demostrado el papel del sistema opioide en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), éste participa en funciones como la regulación y diferenciación neural. Se le ha propuesto como regulador trófico inhibitorio. Los péptidos más estudiados en este campo son los derivados de la proencefalina, como la met-enkefalina (ME). Su efecto es mediado por sus receptores específicos. Además se ha reportado la presencia del ARNm de la proencefalina en cultivos de neuronas y astrocitos embrionarios y perinatales. Nuestro grupo demostró la existencia y distribución anatómica de los péptidos opioides en el SNC e hipófisis del *Ambystoma mexicanum*, así como los cambios en la distribución de estos péptidos en la hipófisis durante la metamorfosis. El interés de este estudio fue determinar en que etapa del desarrollo ontogenético del sistema nervioso central del *A. mexicanum* se inicia la presencia de la inmunoreactividad a péptidos opioides tales como: Leu- y met-enkefalina (LE, ME) y el octapéptido Met-Arg-Gli-Leu (OCTA), así como su distribución anatómica desde la neurulación (Etapa 13), hasta los seis meses de edad (etapa juvenil). Para ello, se utilizaron ajolotes de la especie *A. mexicanum* colectados en el Lago de Xochimilco, los cuales se mantuvieron en condiciones de laboratorio. Durante el invierno y la primavera se formaron parejas y se obtuvieron ovoposiciones naturales. Además se desarrolló un método de fertilización *in vitro*. Se obtuvieron muestras de los embriones y larvas (desde la neurulación hasta los seis meses de edad). Se utilizó la técnica indirecta de inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales dirigidos contra LE, ME y OCTA, con sus respectivos controles. Los resultados fueron: en las muestras anteriores al día 11 no se observó inmunoreactividad en ninguna de las áreas cerebrales. El día 12 se encontró una densidad escasa de fibras inmunorreactivas (FIR) a LE, ME y OCTA dentro del núcleo preóptico (NPo), tálamo ventral (PvT), núcleos paraventriculares hipotalámicos (NPvHt), tegmentum dorsal (TgD) e ístmico (Tgl) y en la zona motora (ZM) del rombencéfalo. El hipotálamo (Ht) presentó FIR con una densidad media a ME y LE. Este mismo patrón de distribución se mantuvo hasta los 30 días, posteriormente comenzaron a haber grupos pequeños de neuronas inmunorreactivas (NIR) (2-3 neuronas) a los tres anticuerpos probados en el NPvHt e Ht. Además, se vio un ligero aumento en la densidad de FIR. En los días 49, 60, 90 y 180 hay un aumento de FIR y de grupos de NIR a LE y ME en los núcleos hipotalámicos. La densidad de FIR para OCTA en estos días fue ligera y se localizaron principalmente en el NPvHt y en el Ht. Nuestros resultados y los de otros autores demuestran que los péptidos opioides están presentes en etapas tempranas del desarrollo, sugiriendo que éstos pueden estar participando en diferentes funciones relacionadas con el desarrollo y formación del SNC de este anfibio. Este trabajo será la base para estudios futuros en donde se conozca el posible papel que tienen los péptidos opioides durante el desarrollo del SNC del *A. mexicanum*.

Lista de Abreviaciones

Cartilago (C)	Núcleo paraventricular hipotalámico (NPvHt)
Canales semicirculares (CS)	Núcleos septales (NS)
Comisura anterior (CA)	Palio dorsal (PD)
Cerebelo (Cb)	Parte ventral talámica (PvT)
Comisura hipocampal (CHp)	Parte dorsal talámica (PdT)
Cuarto ventriculo (IVv)	Oído (Od)
Eminencia media (EM)	Ojo (Oj)
Formación reticular (FR)	Penduculo (Ped)
Ganglio del VIII par (GvVIII)	Pineal (P)
Habenula (Hb)	Tálamo ventral (Tv)
Hipófisis (Hp)	Tectum (Te)
Hipotalámico (Ht)	Tegmentum istmico (TgI)
Infundíbulo (In)	Tegmentum dorsal (TgD)
Médula oblongada (MO)	Tegmentum ventral (TgV)
Narina (na)	Tercer ventriculo (IIIv)
Notocorda (N)	Rombencéfalo (ROM)
Núcleo anterior olfatorio (NAO)	Ventriculo lateral (VL)
Núcleo amigdalino (NA_m)	Zona motora (ZM)
Núcleo estriado amigdalino (NEA_m)	
Núcleo fascicular solitario (NFS)	
Núcleo reticular solitario (NRS)	
Núcleo istmico (NI)	
Núcleo preóptico (NPo)	

ANTECEDENTES

El opio y sus alcaloides se han utilizado por sus efectos medicinales y euforizantes desde tiempos inmemoriales. Goldstein y col. (1971), sugirieron la existencia de sitios de unión estereoespecíficos para estas sustancias. Fue hasta la década de los años setenta en que Terenius en Suiza (1973) y Snyder en Baltimore (Pert y Snyder, 1973) identificaron los receptores a la morfina. Más tarde, en 1975, Hughes y colaboradores identificaron y secuenciaron en el cerebro a las encefalinas, la metionina-encefalina (ME) y la leucina-encefalina (LE). Goldstein y col. (1971) identificaron la estructura de la Beta-endorfina (BE) provenientes de la hipófisis del bovino y del cerdo. Guillemin y colaboradores (1976), determinaron la estructura de la alfa y gama endorfina, aisladas de extractos de hipotálamo e hipófisis.

Actualmente, 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 originales del opio y sus derivados sintéticos a los que se llaman opiáceos.

Los péptidos opioides provienen de tres proteínas precursoras inactivas: la Proopiomelanocortina (POMC) (Nakanishi et al., 1979), la Proencefalina A (PEF) (Comb et al., 1982; Gubler et al., 1982; Noda et al., 1982) y la Prodinorfina o Proencefalina B (PDNF) (Kakidani et al., 1982). Estos precursores se procesan durante su transporte intracelular para dar origen a la molécula activa (Steiner, 1984) y presentan características parecidas entre ellas en cuanto a peso molecular y número de aminoácidos. Estas similitudes sugieren una relación evolutiva entre las tres diferentes proteínas precursoras (Fig. 1). Además, estas moléculas provienen de una familia de genes y de productos de

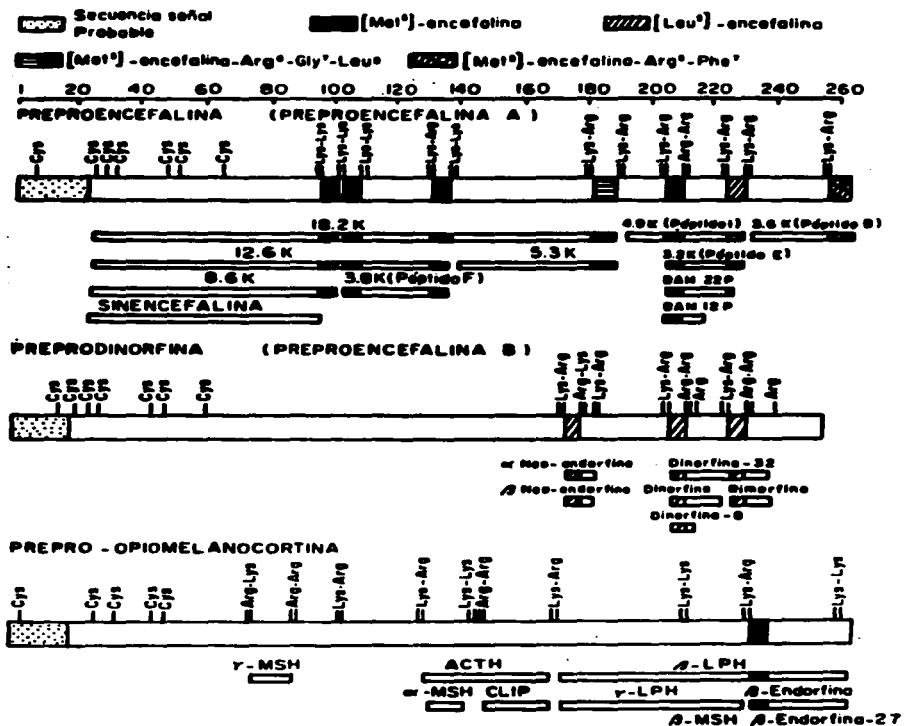


Figura 1. Representación esquemática del proceso proteolítico de las tres prohormonas que contienen péptidos opioides. Están señalados los aminoácidos básicos ya sean sencillos o en pares. Se ilustran únicamente los péptidos aislados y secuenciados en mamíferos. Esta figura es una modificación de los esquemas previos publicados por Nakanishi y col., (1979) y Udenfriend y Kilpatrick, (1983).

genes relacionados funcionalmente. Los estudios inmunohistoquímicos de distribución anatómica demuestran que los tres precursores de los péptidos opioides son expresados en distintas poblaciones celulares en el cerebro y en la hipófisis (Rossier et al., 1977; Khachaturian et al., 1985).

Actualmente, se tienen evidencias de que los péptidos opioides actúan como sustancias neuromoduladoras y poseen cualidades analgésicas. Se ha establecido la participación de estos péptidos en muchas otras funciones, tales como en los procesos de modulación de la información sensorial, en la fisiopatología del estrés, en la regulación de los sistemas cardio-vascular, respiratorio, gastrointestinal, renal y neuroendócrino, en la termorregulación, en la regulación de la ingesta de los alimentos e hidratación, en la regulación de funciones como la conducta sexual, la locomoción, el crecimiento, la memoria y el aprendizaje, y su participación en desordenes mentales y neurológicos como la esquizofrenia y la epileptogénesis (Akil et al., 1976; Olson et al., 1993).

ASPECTOS FILOGENETICOS

Los péptidos opioides se han identificado mediante estudios inmunohistoquímicos y con métodos bioquímicos; se han aislado y secuenciado en diferentes especies de invertebrados y vertebrados. Se expresan desde organismos unicelulares (Leroith et al. 1982), pasando por invertebrados, protocordados y vertebrados incluyendo a los mamíferos (tabla Ia y Ib) (Bayón et al. 1980a, Brauth, 1984; Cone y Goldstein, 1982; Dores et al., 1984; León-Olea et al. 1987; León-Olea et al., 1991; Leung y Stefano, 1984; Stefano et al. 1980; Stefano et al., 1982).

Los resultados de las investigaciones sobre el comportamiento, la fisiología y la farmacología muestran que los péptidos opioides así como los antagonistas y agonistas

Tabla 1a. PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA

ESTRUCTURAS			
PHIUM	β-ENDORFINA	ENCEFALINAS	DINORFINAS
CORIDACTOS			
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	Hilm	TE,DI,ME,RO,Hilm	Cerebro ⁺
<i>Pseudemys scripta</i>			
Lagarto	Hilm,DI,ME	TE,DI,ME,RO,Hilm	Cerebro ⁺
<i>Anolis carolinensis</i>			
Caimán	Hi Im	-----	Cerebro ⁺
<i>Alligator mississippiensis</i>			
Anfibios			
Rana			
<i>Rana esculenta</i>	-----	TE,DI,ME,RO,HiEm	Cerebro ⁺ , médula y NeHi
Sapo			
<i>Bufo marinus</i>	Hilm	NHi,HiEm	-----
Salamandra			
<i>Ambystoma mexicanum</i>	Hi(LA,LI)	HiEm,TE,DI,ME,RO	Hi (LA,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 litia</i>	-----	Cb	-----
<i>C. auratus</i>	NPo,Ht	Hi,Me (NVS)	-----
Agastes			
Lamprea			
<i>Petromyzon marinus</i>	-----	AdHi	-----

Abreviaciones: AdHi adanohipofise, CAH Corpus altatum, CC Corpus cardiacum, CEAm Complejo, CeNE Complejo neural, DI Dianorfinas, EM eminencia media, GC Ganglio cerebroides, GPa Ganglio parietal, GPd Ganglio pedial, GPt Ganglio pleural, GSB Ganglio subesofágico, HI Hipofisario, HIL Hipofise parte interna, LA Lóbulo anterior, LI Lóbulo interno, ME Mesencefalo, NHi Neurohipofise, NPo Nucleo preoptico, P/M Puerile/médula, RO Romboencefalo, TE Telencefalo. + Organismo y cerebro completo.

Tabla Ib. PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA

PHILUM	ESTRUCTURAS		
	β -ENDORFINA	ENCEFALINAS	DINORFINAS
Tunicados			
<i>Asidea</i>			
<i>Clona intestinalis</i>	CoNe	Organismo comp.	-----
Artropodos			
Insectos			
<i>Locusta migratoria R. y F.</i>	-----	GSb	-----
<i>Bombyx mori L.</i>	-----	GSb	-----
<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	GSb	-----	-----
<i>Calliphora vicina</i>	Cerebro ⁺ , CC	CC, CAII	-----
<i>Leucophaea maderae</i>	-----	CC, CAII	-----
Crustaceos			
<i>Carcinus maenas</i>	-----	Cerebro ⁺	-----
<i>Squilla mantis</i>	-----	Cerebro ⁺ , ganglio dorsal	-----
Moluscos			
<i>Helix aspersa</i>	GPd, GPI, GPa, GC	GPd, GPI, GPa, GC	-----
<i>Mytilus edulis</i>	-----	GPd	-----
<i>Octopus vulgaris</i>	-----	Cerebro ⁺ , LOp, GSI	-----
<i>Loligo vulgaris</i>	-----	Cerebro ⁺ , lóbulos	-----
Anelidos			
Lombriz de tierra			
<i>Lombicus terrestris</i>	GC	GC	-----
Platelmintos			
<i>Planaria</i>	-----	Organismo comp. ⁺	-----
<i>sanguiucla</i>	-----	Organismo comp. ⁺	-----
Porifera			
Esponja			
<i>Dysidea avara</i>	-----	Organismo comp. ⁺	-----
Anemona			
<i>Anemonia sulcata</i>	-----	Organismo comp. ⁺	-----
Ciliófera			
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Organismo comp. ⁺	-----	-----

Abreviaciones: AdNI edenohipófisis, CAII Corpus allatum, CC Corpus cardiacum, CEAm Complejo, CoNE Complejo neural, DI Diencefalo, EM eminencia media, GC Ganglio cerebroide, GPa Ganglio parietal, GPd Ganglio pedal, GPI Ganglio pleural, GSb Ganglio subesofágico, NI Hipófisis, NI Hipófisis, NIin Hipófisis parte intermedia, LA Lóbulo anterior, LI Lóbulo intermedio, ME Mesencefalo, NI Neurohipófisis, NPo Nucleo preóptico, PM Punta/médula, RO Rombencefalo, TE Telencefalo.

sintéticos semejan las acciones de los opioides encontrados en los mamíferos (Josefsson y Johansson, 1979; Kavaliers y Hirst, 1989). Los estudios de unión estereoespecífica de alta afinidad para los ligandos opioides en tejido nervioso de vertebrados inferiores, moluscos y otras especies de invertebrados presentan propiedades similares a las del tejido nervioso de mamíferos (Stefano et al., 1982). Estas observaciones implican que tienen un desarrollo evolutivo temprano y una continuidad filogenética de los péptidos opioides y sus receptores.

PEPTIDOS OPIOIDES EN ANFIBIOS

Como se describió en el inciso anterior, los péptidos opioides y sus receptores se encuentran en casi todos los organismos de la escala filogenética. Sin embargo, es hasta los anfibios que existen evidencias de que las proteínas precursoras de los péptidos opioides y sus receptores son estructuralmente homólogas a las de los mamíferos (Kilpatrick et al., 1983; Martens et al., 1984; Martens et al., 1985).

Martens y Herbert (1984) examinaron por medio de técnicas de biología molecular en la rana *Xenopus laevis*, el gen que codifica la proencefalina, y encontraron 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 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 de *X. laevis* no está contenida la secuencia de la LE. Hay evidencias en otros anfibios anuros en donde sucede lo mismo (Kilpatrick et al., 1983). Es por esto que se ha supuesto que la organización de la proencefalina en el *X. laevis* es representativa del grupo de los anuros y que la LE presente en el cerebro de este anfibio puede provenir de la prodinorfina (Martens et al., 1984).

La distribución de los péptidos opioides, principalmente las encefalinas, en el sistema

nervioso central de diferentes especies de anfibios se ha demostrado con la utilización de técnicas inmunohistoquímicas y bioquímicas (Estos resultados se resumen en la tabla II).

Los anfibios son un grupo de interés ya que durante la evolución de los vertebrados es la clase donde se encuentra la etapa de transición entre la vida acuática y la terrestre. Este paso requiere cambios funcionales importantes y modificaciones anatómicas notables para su adaptación al nuevo ambiente, lo que los hace una grupo interesante para diferentes estudios.

Tabla II. Péptidos opioides en anfibios.

ANFIBIO	PEPTIDO OPIOIDE	ESTRUCTURA CEREBRAL
<i>Xenopus laevis</i>	POMC y derivados	Hipófisis (LN) (Vaudry y col., 1984)
	Proencefalina	Hipotálamo y tectum (Merchenthaler y col., 1987)
<i>Rana rudibunda</i>	POMC y derivados	Hipófisis (LN) (Vaudry y col., 1984)
<i>Rana esculenta</i>	Proencefalina	Hipotálamo y tectum (Merchenthaler y col., 1987) Cerebro (Merchenthaler y col., 1989)
<i>Rana temporaria</i>	α y β -endorfina ME	Cerebro completo (Doerr-Schott y col., 1981)
<i>Bufo marinus</i>	Din (1-13)	Hipófisis (LN), cerebro y médula (Cone y col., 1983)
	Proencefalina (LE, ME, heptapéptido)	Hipotálamo y tectum (Merchenthaler y col., 1987)
<i>Ambystoma mexicanum</i>	LE, ME	Cerebro completo (Asai y col., 1988)
	LE, ME, Din (1-8) y β -endorfina.	Hipófisis (León-Olea y col., 1991)
	LE, ME y OCTA	Cerebro (Sánchez-Islas y col., 1993).

Abreviaciones: LE, leucina-encefalina; ME metionina-encefalina; OCTA, octapéptido; Din, dinorfina; LN lóbulo neural.

EL AXOLOTL, *Ambystoma mexicanum*

Características biológicas

El *Ambystoma mexicanum* es un anfibio "neoténico obligado inducible", esto quiere decir que no presenta metamorfosis en condiciones naturales, llega a la madurez sexual y se reproduce conservando su morfología de larva. La metamorfosis se puede inducir experimentalmente, mediante la administración de tetrayodotironina (T4) lo que desencadena una serie de eventos metabólicos que producen la transformación. La temporada de reproducción de estos anfibios es en el invierno y en la primavera. Durante este periodo, el macho deposita el espermatóforo, el cual colecta la hembra con la cloaca. La fecundación de los huevos se realiza endógenamente y el desarrollo embrionario exógenamente. Por lo que el proceso de desarrollo se puede seguir y manipular, en cada una de las etapas. Por estas características biológicas particulares resulta ser un modelo idóneo para diferentes estudios (p. ej. ontogénicos, filogenéticos y fisiológicos).

Por otro lado, la reproducción del *A. mexicanum* en cautiverio es un proceso laborioso, ya que se tienen que controlar diferentes parámetros (como por ejemplo: el ciclo de luz-obcuridad, la alimentación, la temperatura, la calidad del agua, la salud de los animales, etc.). Sin embargo, se puede lograr esto en la temporada de reproducción. Para la obtención de huevos fértiles fuera de la época de reproducción, se han utilizado las técnicas descritas por Armstrong y Gillespie (1976) y Slack (1984) (ver anexo I). Estos procedimientos consisten en la aplicación de hormonas (FSH, LH y GCH) para estimular la ovoposición y la liberación del espermatóforo (ver anexo I). La ventaja que tiene este tipo de procedimientos es la de obtener huevos fértiles cuando se requieran.

Péptidos opioides en el *A. mexicanum*

En este anfibio se han realizado estudios con técnicas bioquímicas para la cuantificación e inmunohistoquímicas para la localización anatómica de los péptidos

opioides (encefalinas, β -endorfina y dinorfinas) en el sistema nervioso central.

Asai y colaboradores (1988) demostraron, mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), la presencia de encefalinas (LE y ME) en el cerebro e hipófisis del *Ambystoma mexicanum*.

Nuestro grupo reportó la existencia y distribución de la inmunorreactividad a péptidos opioides tales como Leu, Met- encefalinas, β -endorfina y dinorfinas en la hipófisis del *A. mexicanum* (León-Olea et al., 1991). Donde uno de los datos relevantes es la presencia de inmunorreactividad a Leu-encefalina en la adenohipófisis del adulto neoténico, hecho que no se había reportado en otras especies. También se reportó que al inducir la metamorfosis con tiroxina, la inmunorreactividad a Leu-encefalina desaparece en el lóbulo anterior de la hipófisis de la salamandra (estado adulto del *Ambystoma*). Estos resultados muestran que estos péptidos sufren cambios en su distribución anatómica durante el desarrollo de la metamorfosis (León-Olea et al., 1996).

Recientemente hemos estudiado la distribución de encefalinas en el cerebro del axolotl y ésta se presenta de manera similar a la de los mamíferos y otros vertebrados. En el telencéfalo la concentración de neuronas y fibras inmunorreactivas a encefalinas se encuentra principalmente en el complejo estriamigdalino y en la región septal. En el diencéfalo, en los núcleos habenuares, talámicos e hipotalámicos y con una menor densidad en el mesencéfalo y el rombencéfalo (fig. 2 y tabla III) (Sánchez-Islas et al., 1993).

ONTOGENIA DE LOS NEUROPEPTIDOS

El desarrollo fetal del sistema nervioso central involucra una secuencia específica de eventos que incluyen: a) la generación de células en las etapas germinales, b) la subsecuente migración y c) la diferenciación dentro de las neuronas maduras, las cuales se

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

Estructuras	LE		ME		OCTA	
	NIR	FIR	NIR	FIR	NIR	FIR
TELENCEFALO						
Urbio olfatorio	-	+	-	++	-	+
Palo dorsal	-	+	-	+	-	++
Palo piriforme	-	+	-	+	o	+
Palo hipocámpal	o	+	o	+++	-	+++
Núcleo septales	o	+++	o	+++	-	+++
Núcleo acuménis	-	+++	-	+++	-	+++
Cuerpo espiado	-	+++	-	+++	-	+++
Núcleo amigdalino	-	+++	-	+++	-	+++
Núcleo caudado	-	+++	-	+++	-	+++
Comisura anterior	o	+++	o	+++	o	++
Comisura hipocámpal	o	+++	o	+++	o	++
Tractus ventrales	-	+++	-	+++	-	+++
DIENCEFALO						
Núcleo habenuares	-	+++	-	+++	-	++
Núcleo preoptico	▲	+++	▲	+++	▲	+++
Núcleo talámicos	▲	+++	▲	+++	▲	+++
Núcleo hipotalámicos	■	+++	■	+++	■	+++
MESENFALO						
Tectum	o	++	o	++	▲	++
Tegmentum	-	++	-	++	o	++
Istmo	-	++	-	++	-	++
Cerebelo	-	+	-	+	-	++
ROMBENCEFALO						
Médula oblongada						
Zona sensorial	-	+	-	+	o	+
Formación reticular	o	++	o	++	o	++
Zona motora	o	+++	o	+++	-	++

Notaciones: Neuronas inmunorreactivas (NIR). - = ausencia de NIR, o = de 1-5, ■ = 5-10, ▲ = 10 o más neuronas. Fibras inmunorreactivas (FIR). Densidad de FIR: escasa (+), media (++) y alta (+++)



Fig. 2. Esquema de un corte parasagital del cerebro del axolotl adulto, *Ambystoma mexicanum*, donde se muestra la distribución de las neuronas y fibras inmunorreactivas a LE, ME y OCTA. Las NIR a LE y ME se representan con (o) de 1-5 neuronas por corte, (▲) de 5 a 10 neuronas, (■) de 10 o más neuronas. Para OCTA con (o) de 1-5 neuronas por corte, (▲) de 5 a 10 neuronas, (■) de 10 o más neuronas. La densidad y localización de FIR a LE y ME por: (+) escasa, (++) media y (+++) alta. Para OCTA por (o) escasa, (//) media y (///) alta. La línea continua representa el límite entre la sustancia blanca y la sustancia gris.

incorporan dentro de un circuito neuronal funcional resultado de la formación de neuritas y sinapsis. Los diferentes tipos de neuronas son generados en varias regiones y estados de la ontogenia, tanto que la integración funcional de un tipo dado de neurona con otras se define desde un momento dado para el inicio de sus funciones. El desarrollo de un circuito neuronal complejo es sensible a postergarse o adelantarse y a incrementar o decrecer en alguno de los eventos de neurogénesis, migración y maduración. Tales cambios pueden dar origen no únicamente a alteraciones de organización a nivel celular, sino también a cambios visibles a nivel macroscópico (Boer y Swaab, 1985).

Los procesos de neurogénesis están controlados por programas genéticos intrínsecos en interacciones con factores epigenéticos tales como factores tróficos y de crecimiento (p.ej., somatomedinas y hormonas: hormonas tiroideas, corticoesteroides y hormonas gonadales) y factores funcionales involucrados directa o indirectamente en la neurotransmisión. Los neuropéptidos pueden tener representantes en todas estas clases de sustancias (Boer y Swaab, 1985).

En las etapas tempranas del desarrollo, los neuropéptidos pueden ser identificados por medio de técnicas cuantitativas como el radioinmunoanálisis y la cromatografía líquida de alta presión o por técnicas cualitativas como las inmunocitoquímicas (Swaab y Ter Brog, 1981). Se ha determinado la existencia de una serie de neuropéptidos en las primeras etapas de la neurogénesis alrededor del día 13 prenatal en la rata. El neuropéptido Y se ha identificado en el día 13 de la gestación (Foster y Schultzberg, 1984) y la somatostatina y sustancia P en el día 14 (McGregor et al. 1982). Los péptidos neurohipofisarios, vasopresina y la oxitocina se encuentran desde la etapa fetal (día 14 y 17) (Buijs et al., 1980), mientras que las fibras vasopresinérgicas aparecen inmunorreactivas en el día 16 (Boer et al., 1980; Buijs et al., 1980). Los péptidos de la familia de la proopiomelanocortina están presentes desde el día 15 de la gestación (Bayón et al., 1979b, Swaab y Martin, 1982).

El factor estimulante de la liberación de la hormona luteinizante se ha identificado desde el primer día del nacimiento (McGregor et al., 1982) y el de la hormona tiroidea en el día 18 (Conkkin et al., 1973). La neurotensina todavía no está presente en los primeros 10 días postnatales (Aperi et al., 1982).

Ontogenia de los péptidos opioides (encefalinas)

Existen pocos estudios de la ontogenia de los péptidos opioides. Dentro de estos se encuentra el realizado por Bayón y col. (1979) en donde se reportó que en embriones de 16 días, los niveles de la β -endorfina son más altos que los niveles de Leu-encefalina en el telencéfalo, diencéfalo y en regiones del mesencéfalo y puente. En el adulto se invierten estos niveles, los de Leu-encefalina son más altos que los de β -endorfina. En la etapa perinatal, el contenido de Leu-encefalina se incrementa más rápidamente que los de β -endorfina en todas las regiones del cerebro, produciendo un marcado descenso de la tasa de Leu-encefalina/ β -endorfina. Entre los días 6 y 25 postnatales, los niveles de β -endorfina y Leu-encefalina se incrementan notablemente (Bayón et al., 1979b).

Posteriormente, Palmer y col. (1982) realizaron un estudio más detallado del desarrollo ontogenético de encefalinas en el sistema nervioso central de la rata. Ellos encontraron en el día 15 prenatal, fibras inmunorreactivas localizadas desde la parte medio-ventral del puente hasta la médula espinal, en el día 18 presenta células inmunorreactivas en varias áreas del cerebro (p. ej. tubérculo olfatorio, hipotálamo, putamen caudado, cerebelo, bulbo, mesencéfalo y médula). En el día 21-22, la distribución de células y fibras inmunorreactivas comienza a parecerse a la distribución del adulto (Fig. 3).

Por medio de la técnica de hibridación *in situ*, se ha determinado la ontogenia prenatal de los ARNs mensajeros de los tres sistemas de precursores de opioides en el

el sistema nervioso central del ratón y del cerdo (tabla IV). El ARNm de la proopiomelanocortina se detecta a los 10.5 días de gestación (dg) en el diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo (Elkabet al., 1989); la proencefalina A en el ratón se detecta a los 12.5 dg en el talámo, el puente, los plexos coroides y en el bulbo raquídeo (Keshet et al., 1989); mientras que en el cerdo entre los 25 y 50 dg en el estriado e hipocampo (Pittius et al., 1987); por último, la prodinorfina o proencefalina B en el cerdo aparece en el estriado e hipocampo entre los 25 y 50 dg.

Tabla IV. Ontogenia de los mRNAs de los tres sistemas de precursores de péptidos opioides en el sistema nervioso central.

Preursor	animal	Días de gestación	Localización
Proopiomelanocortina	ratón	10.5	-Diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo+
		12.5, 14.5	-Lóbulo anterior e intermedio de la hipófisis+
Proencefalina A	ratón	12.5	-Tálamo, puente, plexos coroides y médula*
	cerdo	25-50	-Estriado e hipotálamo ^o
Proencefalina B	cerdo	25-50	-Estriado e hipotálamo ^o

^oPittius et al., 1987; + Elkabet et al., 1989; *Keshet et al., 1989.

Papel de los péptidos opioides en el desarrollo del SNC

Se ha reportado que los péptidos opioides, así como otros neuropéptidos, juegan un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central, modulando la proliferación y diferenciación celular (Kilpatrick et al., 1983; Zagon et al., 1994).

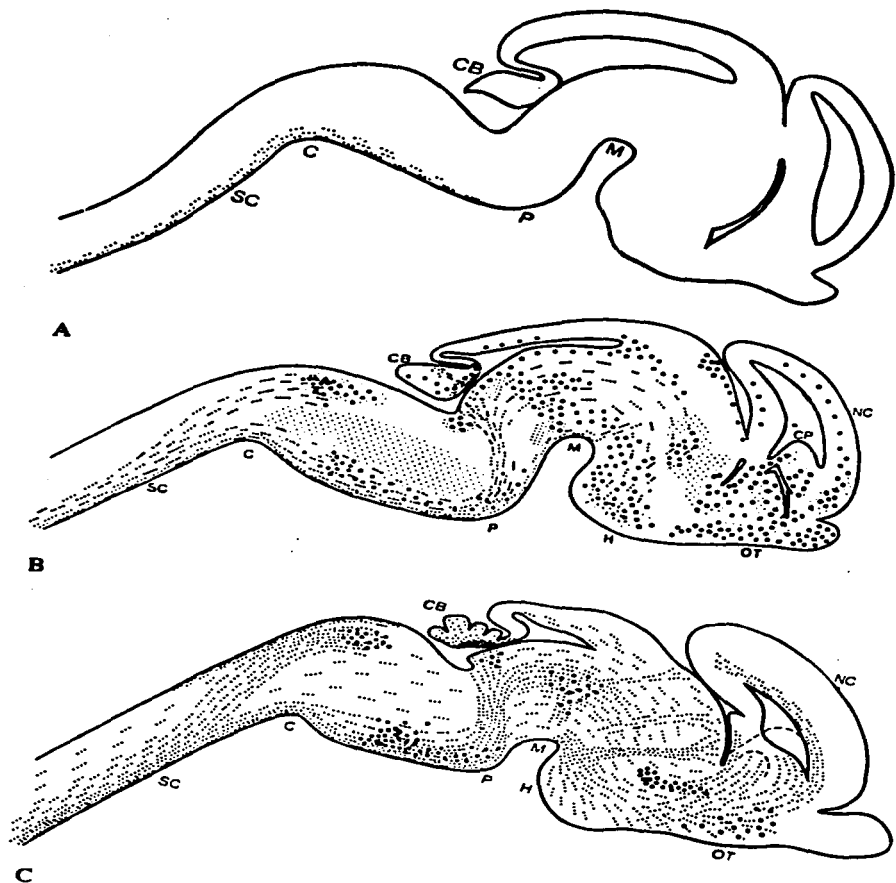


Fig. 3. Esquemas de cortes parasagitales del sistema nervioso central fetal de rata en diferentes días de gestación, donde se muestran neuronas, fibras y terminales inmunorreactivas a encefalinas. **A.** día fetal 15, **B.** día fetal 17-18 y **C.** día fetal 21-22. Símbolos: --- fibras inmunorreactivas, ● neuronas inmunorreactivas, abreviaciones: C flexión cervical, CB cerebelo, CP putamen caudado, H hipotálamo, M flexión mesencefálica, NC neocorteza, OT tubérculo olfatorio, P puente, SC cordón espinal (Esquemas tomados de Palmer y col., *MEd. Biol.* 60:61-88, 1982).

El papel principal del sistema opioide endógeno en el desarrollo del cerebro se ha comprobado, en gran parte, mediante experimentos donde se utilizan antagonistas opioides para interrumpir la interacción de opioides endógenos y receptores opioides. Los antagonistas opioides ejercen una marcada influencia esteroespecífica en el crecimiento del tejido neural (Zagon y McLaughlin, 1985). El efecto depende del tiempo y la dosis de antagonista utilizado para bloquear a los receptores opioides, (p ej. inhibición o aumento del peso cerebral) en el desarrollo del SNC (Zagon y McLaughlin, 1984).

En experimentos con ratas predestetadas que recibieron inyecciones diarias de naltrexona, que es un potente antagonista opioide, a una dosis de 50 mg/kg , para bloquear los receptores opioides durante 24 h. Se encontró que se incrementa el peso corporal, cerebral y de algunos órganos, además de acelerar la aparición de características físicas y la maduración de conductas motoras y sensomotoras (Zagon y McLaughlin, 1983; Zagon y McLaughlin, 1984; Zagon y McLaughlin, 1985). En contraste, cuando se administra una dosis diaria de 1 mg/kg de naltrexona, para bloquear los receptores opioides de 4-6 h cada día, se inhibe el desarrollo. Por otro lado, durante la fase mitótica neuronal de los primeros días de la vida postnatal, los efectos morfológicos (p. ej. un aumento del tamaño cerebral) producidos en la modulación opioide-antagonista del desarrollo neurobiológico tienen un marcado cambio en la población celular. Por ejemplo, en el cerebelo de la rata, al realizar un bloqueo completo de los receptores durante el período de predestete, se observó que al día 21, hay un incremento significativo del número de neuronas granulares internas y de células gliales. Sugiriendo que los opioides endógenos intervienen en la neurontogenia como inhibidores de la proliferación celular (Zagon y McLaughlin, 1983; Zagon y McLaughlin, 1986; Zagon y McLaughlin, 1986).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los estudios ontogenéticos en mamíferos se ha encontrado que los péptidos opioides, principalmente el sistema encefalérgico aparece en estadios tempranos (12-14 días de gestación), en concentraciones muy pequeñas, las cuales varían durante el desarrollo, pudiendo jugar un papel importante durante el desarrollo y crecimiento del sistema nervioso. En los anfibios no se han llevado a cabo este tipo de estudios, por lo que es importante conocer en qué momento del desarrollo embrionario, en especial en el axolotl (*Ambystoma mexicanum*) se inicia la síntesis de los péptidos opioides, en qué regiones se distribuyen, cuál es la morfología de las células que los contienen, y si la aparición de estas células es un proceso simultáneo que se da en varias regiones o tiene un origen común. Este estudio será la base para iniciar otros experimentos fisiológicos donde se conozca el posible papel que tienen estos péptidos durante el desarrollo del *A. mexicanum*.

HIPÓTESIS

En mamíferos se ha descrito la presencia de péptidos opioides en etapas tempranas del desarrollo del SNC. En el *Ambystoma mexicanum*, hemos demostrado la existencia y distribución anatómica de los péptidos opioides en el cerebro del adulto neoténico. Por lo que es de interés conocer su distribución durante el desarrollo del SNC de este anfibio y en qué momento se inicia la presencia de inmunorreactividad a estos péptidos.

Por otro lado se ha documentado que los péptidos opioides en estadios tempranos tienen un papel importante en el crecimiento y desarrollo del SNC de mamíferos, por lo que deben de estar presentes en etapas tempranas del desarrollo del SNC de este anfibio.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

-Realizar un estudio de la distribución anatómica de la inmunorreactividad a péptidos opioides tales como: Leu-, Met- encefalinas y octapéptido durante el desarrollo ontogenético en el sistema nervioso central del axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Iniciándose en la etapa de neurulación hasta la etapa juvenil, utilizando la técnica indirecta de inmunofluorescencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

-Conocer en qué etapa y en que estructura o estructuras del SNC del *A. mexicanum*, se inicia la inmunorreactividad a péptidos opioides en neuronas y fibras.

-Establecer las diferencias en la distribución de los péptidos opioides en las diferentes etapas del desarrollo embrionario con la del adulto.

-Comparar la distribución de los péptidos opioides durante la ontogenia del *A. mexicanum* con la de otras especies de vertebrados reportados en la literatura.

-Estandarizar el método de fertilización *in vitro* del ajolote *A. mexicanum* para la obtención de huevos fértiles.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ajolotes de la especie *Ambystoma mexicanum* adultos neoténicos de uno y otro sexo, los cuales se obtuvieron del Lago de Xochimilco en México, D.F. y se mantuvieron en un acuario abierto con una temperatura de 18 a 20°C, con un ciclo artificial de luz/obscuridad de 10/14h y se alimentaron con peces vivos pequeños y artemia salina.

Para llevar acabo este estudio fue necesario la obtención de embriones en distintas etapas del desarrollo, los cuales se obtuvieron de dos procedimientos: ovoposición natural en condiciones del laboratorio y por fertilización *in vitro*.

Ovoposición natural

Para la reproducción natural del axolotl, que es en el invierno y la primavera, se utilizaron 10 parejas de axolotls y se colocaron dos parejas de animales por pecera hasta su reproducción en condiciones de laboratorio durante estas dos épocas. Las peceras se prepararon con filtros de arena y se oxigenaron por medio de bombas para acuario, con un filtro adicional de carbón activado para mantener la pureza del agua.

Fertilización *in vitro*

Para llevar acabo la fertilización *in vitro* es necesario primero la estimulación de la ovoposición, la cual se realizó mediante la aplicación de hormonas (tabla V). Además, se tomaron como base dos métodos para este proceso: el de Armstrong y Gillespie (1976) y el de Slack (1984) (ver anexo I), apartir de estos protocolos se estandarizó una técnica de fertilización *in vitro* para las condiciones de nuestro laboratorio.

Con base en estos dos métodos se llevaron a cabo 12 experimentos donde se utilizaron 22 ajolotes (12 hembras y 10 machos), además se hicieron, en cada ensayo, las siguientes variantes para llegar a la estandarización del método:

-La aplicación de las hormonas: foliculo estimulante (FSH), NHPP o-FSH-18, leutinizante (LH), NHPP bLH-6 y la gonadotropina coriónica (GCH) a diferentes dosis (tabla V).

-El lugar de aplicación de la hormona (intraperitoneal e intramuscular).

-La frecuencia de colecta de los huevos después de la ovoposición.

-Horario de la aplicación de la hormona (en la mañana o en la tarde).

-Estimulación del macho.

-Manipulación de los conductos deferentes.

-Medios de cultivo para los espermatozoides (tabla VI).

-La temperatura del agua de las peceras.

Tabla V. Hormonas y dosis utilizadas para estimular la ovoposición.	
Hormona	Dosis
FSH (Sigma)	80 U.I. y 400 U.I
NHPP o-FSH-18 *	0.1 mg = 700 UI
LH (Sigma)	50 µg = 5.3 UI
NHPP bLH-6*	20 µg = 550 UI
GCH (Sigma)	250, 350 y 600 U.I.
*Hormonas donada por la asociación National Hormone and Pituitary Program (NHPP). UI unidades internacionales.	

Para mantener viables a los espermatozoides en los experimentos de fertilización *in vitro*, se probaron dos medios de cultivo, ringer normal para anfibio y la solución de Steinberg. En la tabla VI se muestran los ingredientes de estos dos medios de cultivo.

Tabla VI. Medios de cultivo para los espermatozoides			
Ringer Normal para Anfibio*		Sol. de Steinberg+	
5.8 g	NaCl	3.4 g	NaCl
0.112 g	KCl	0.05g	KCl
0.049 g	Mg Cl ₂ .7H ₂ O	0.05g	Ca Cl ₂
0.22 g	CaCl ₂	0.205 g	MgSO ₄ . 7 H ₂ O
2.73 g	ZnCl ₂	1.10 g/lt	Hepes
0.71 g/lt	Hepes	a pH 7.4	
a pH 7.4			

*Kao y Elison. 1988; +Zackson y Steinberg. 1986.

Las hembras se inyectaron en diferentes horarios: 10 a.m., 12 a.m. y 17 p.m. con el fin de obtener las ovoposiciones durante el día.

Experimentos de fertilización *in vitro*.

Experimento 1. A una pareja de ajolotes (macho y hembra) se les aplicó 250 UI de GCH (Sigma) i.m..

Experimento 2. Dos parejas de ajolotes. A la primera se le aplicó 250 UI de GCH (Sigma) i.m. y a la segunda 350 UI de GCH (Sigma) i.m..

Experimento 3 y 4. Dos parejas de ajolotes. A la primera pareja se le aplicó 700 UI de FSH + 550 UI de LH i.m. (Sigma) y a la segunda 250 UI de GCH (Sigma) i.m..

Experimento 5. A 4 parejas de ajolotes se les aplicaron 600 UI de GCH (Sigma) i.m.

Experimento 6. A 3 grupos de ajolotes, cada uno con 3 hembra y un macho, se les inyectaron 600 UI de GCH (Sigma) i.m. A los dos machos se les inyectó GCH 2 h antes de comenzar la puesta de huevos con el fin de estimular la producción del espermátóforo.

Experimento 7. A un grupo de 5 hembras y 2 machos se les inyectó 600 UI de GCH i.m.. A los machos se les aplicó la GCH 2 h antes de sacrificarlos y posteriormente se les extrajo los conductos deferentes, se maceraron y se hizo una suspensión que contenía Steinberg al 10%. Los huevos se colectaron cada 20 min. y se les agregó la suspensión en gotas (3 gotas).

Experimento 8. Se utilizaron 4 hembras y 2 machos. Se les inyectaron 600 U.I. de GCH i.m.. A los machos se les aplicó la GCH 2 h antes de ser sacrificados y posteriormente se extrajeron los conductos deferentes en este caso no se maceraron sino que se cortaron en trozos pequeños de 5 mm y se colocaron en la solución de Steinberg al 10% con 50 µl de Garamicina. Cada vez que se colectaron los huevos (cada 20 min.), se sacó un trozo de conducto y se oprimió para la obtención de los espermatozoides y se realizó una suspensión que se virtió por encima de los huevos.

Experimento 9 y 10. Para este experimento se utilizaron las hormonas FSH y LH que fueron donadas por la NHPP, y la hormona GCH (Sigma). Se formaron dos grupos de siete ajolotes (4 hembras y 3 machos) cada uno. Al grupo 1 se les aplicaron las hormonas FSH y LH (80 U.I. y 50 µg respectivamente) i.m., y se bajo la temperatura del agua de la pecera a 12 °C. A las 24 h se colocó un macho, sin estimulación hormonal, con el grupo de las hembras.

Al grupo 2 se les aplicó la hormona GCH (600 U.I. i.m.). A las hembras como al macho se les inyectó GCH (600 U.I. i.m.). El macho se sacrificó y se extrajeron los conductos deferentes, los cuales no se cortaron en trozos como en el experimento 4, sino que se dejaron completos y se colocaron en la solución de Steinberg al 10%. Los conductos se cortaron y oprimieron para obtener los espermatozoides y con ellos se realizó una suspensión en un volumen de 5 ml de sol. Steinberg al 10% que virtió sobre los huevos colectados y se dejaron 25 min. con la suspensión. Posteriormente, los huevos se colocaron en una pecera con 2 l de sol. de Steinberg al 20%.

Experimento 11 y 12. Se utilizaron dos grupos de 4 ajolotes (3 hembra y 1 macho) cada uno. A las hembras del primer grupo se les inyectaron las hormonas FSH más la LH (400 U.I. de FSH + 50 μ l de LH, estas hormonas fueron donadas por la asociación NHPP) y al macho no se le aplicó ninguna hormona.

Al segundo grupo de ajolotes, tanto a las hembras como a los machos, se les aplicó la hormona GCH (600 U.I. i.m.). Dos horas antes de comenzar la ovoposición se estimuló al macho con la aplicación de la hormona y posteriormente se sacrificó. Se extrajeron los conductos deferentes, los cuales se procesaron de la misma manera que en el experimento 5 con la diferencia de que se empleó otro medio de cultivo (ringer normal de anfibio al 10%) para conservar los conductos deferentes.

Todos estos experimentos se realizaron fuera de la temporada de reproducción del *A. mexicanum*. En la tabla VII se resumen estos experimentos.

A partir del séptimo experimento se consideró estandarizado el método de fertilización *in vitro* que se empleó en los experimentos 7, 8 y 9 y se muestra a continuación.

Método estandarizado para la fertilización *in vitro*:

Se inyectan de 250 a 600 UI i.m. de la hormona GCH (Sigma) en la parte posterior de la cloaca para inducir la ovoposición en la hembra. La puesta de huevos comienza a las 48 h después de la inyección, 2 horas antes de la puesta se estimula al macho con 250 UI i.m. de

Tabla VII. Experimentos de fertilización *in vitro*

No. de Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Num. de animales empleados en cada gpa. experimental	1 1	2 2	1 1	1 1	4 4	6 2	5 2	4 2	4 3	4 3	3 1	3 1
♀ ♂												
Hormona	GCH	GCH	GCH	FSH +LH	GCH	GCH	GCH	GCH	σFSH +bLH	GCH	σFSH+ bLH	GCH
Dosis (UI)	250	250 350	250	700+ 550	600	600	600	600	80 + 5.3	600	400 + 5.3	600

GCH (Sigma). Posteriormente se anestesia con benzocaina al 0.1 %. Se realiza una disección abdominal para extraer los conductos deferentes. Se mantienen en la solución de Steinberg al 10%. En el momento de la fertilización, los conductos se cortan en trozos de 5 mm y se oprimen para obtener los espermatozoides. Se realiza una suspensión en un volumen de 5 ml de sol. Steinberg al 10% y se mantienen a 10 °C. Los huevos se recolectan cada 20 min., se les quita el exceso de agua con un papel secante y se les agrega por encima unas gotas (3 a 5) de la suspensión de espermatozoides. Se dejan 25 min. en una caja de Petri. Posteriormente se colocan en una caja de acrílico de 35x25 cm con dos litros de solución de Steinberg al 20%, a una temperatura de 18 °C y aireación.

Nota: La dosis de GCH fue de 250 a 600 UI, dependiendo de la época del año, ya que cerca de la temporada de reproducción (diciembre-enero) responde con dosis bajas (250 UI), mientras que cuando se está fuera de esta temporada responden a dosis altas (600 UI).

Muestreo de los diferentes días del desarrollo

Una vez obtenidas las puestas, tanto de la forma natural como la artificial, se siguió el desarrollo de los huevos. Se utilizaron las tablas de desarrollo descritas por Harrison, (1969); Schreckenber y Jacobson, (1980) para saber el momento en que comienza la neurulación (Estadio 13, que se presenta entre las 55 a 56.30 hrs después de la primera división). En esta etapa se inició la colecta de los huevos y se terminó al llegar a la etapa juvenil (3 meses) El muestreo se realizó de la siguiente manera:

A partir de la etapa 13 se colectaron 5 muestras, cada 48 hrs hasta llegar a un 1 mes de edad; posteriormente se escogieron 5 muestras cada 8 días hasta que las larvas tuvieron 2 meses de edad y a los 3 y 6 meses se colectaron 2 muestras. Se obtuvo un total de 21 grupos de muestras. De las cinco muestras de cada grupo se fijaron dos en formol al 10% y tres en paraformaldehído al 4% (Fig. 4).

Se llevaron a cabo dos estudios, uno histológico y otro inmunohistoquímico, los cuales se realizaron paralelamente y a continuación se describen.

ESTUDIO HISTOLOGICO

Este estudio sirvió como base para ver la neuroanatomía de las diferentes muestras colectadas y con los cortes histológicos seriados y teñidos del SNC de *A. mexicanum* se realizaron esquemas donde se marcaron las zonas que presentaron inmunorreactividad a péptidos opioides en los estudios inmunohistoquímicos, ya que no se cuenta con un atlas histológico del desarrollo del cerebro de este anfibio.

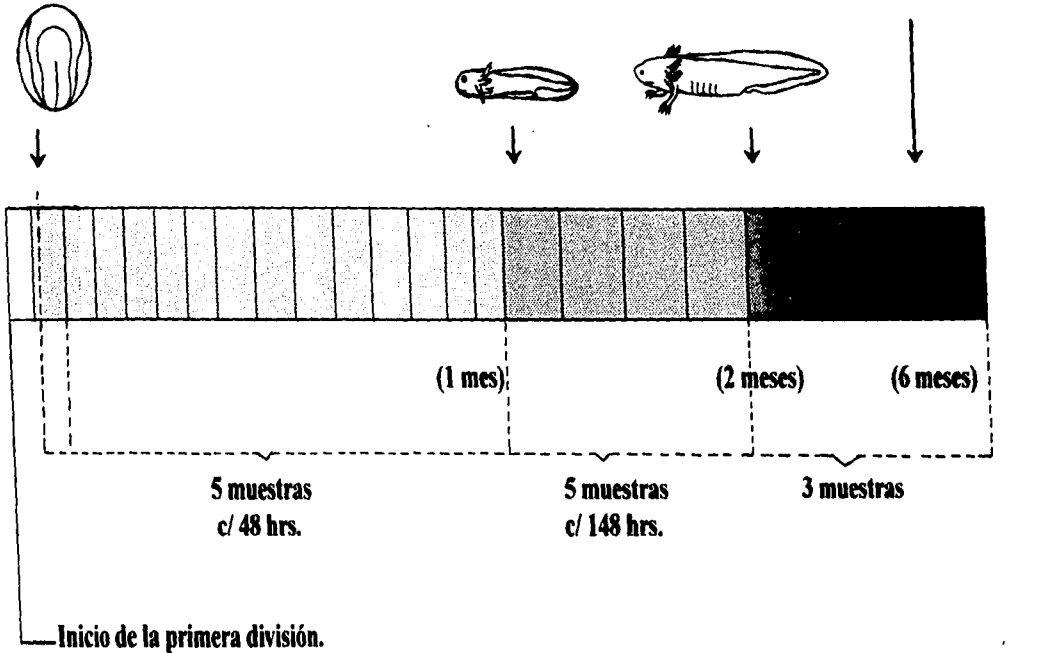
Se utilizaron las muestras fijadas en formol al 10%, durante 24 h, de los diferentes estadios del desarrollo. Se equilibraron en sacarosa (10, 12, 18%) una hora en cada una de ellas para su posterior utilización. Se cortaron en un crióstato a -18 °C se obtuvieron cortes corónales y parasagittales seriados de 15 µm de espesor, se montaron en portaobjetos previamente gelatinados y se tiñeron con safranina al 0.02% (Luna, 1968). Posteriormente se tomaron fotomicrografías con una cámara Leitz de 35 mm. en color con película para diapositivas Ektar 64 y 100 ASA y se utilizaron para hacer los esquemas empleados en los resultados. Estos se hicieron por medio de una ampliadora fotográfica utilizando las diapositivas como negativos y se dibujó la proyección sobre el papel.

ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO

Para este estudio se utilizaron las muestras de los diferentes estadios fijadas con paraformaldehído al 4% durante 24 h, posteriormente se equilibraron en sacarosa (10, 12,

Fig. 4. COLECTA DE LAS MUESTRAS

Etapa 13
(56 hrs.)



Total de grupos de muestras = 21 grupos.

18%) una hora en cada una de ellas y se conservaron en sacarosa al 18% a 4 °C hasta su posterior utilización. Se cortaron en un crióstato a -18 °C se obtuvieron cortes coronales y parasagitales seriados de 15 µm de espesor, y se montaron en portaobjetos previamente gelatinados. Se utilizaron antisueros policlonales contra Leu-, Met- encefalinas (LE y ME) y dos contra octapéptido (OCTA). Los antisueros de LE y ME y uno de los de OCTA fueron donados por el M. en C. Miguel Asai del Laboratorio de Análisis Químicos del IMP. Estos anticuerpos han sido desarrollados en conejo de Nueva Zelanda, inmunizados previamente con cada uno de los pentapéptidos (LE,ME) unidos a albúmina (BSA) con glutaraldehído, siguiendo el protocolo de inmunización descrito por Vindrola y col. (1981). Las características bioquímicas de los anticuerpos están reportadas en diferentes trabajos (Vindrola et al., 1984; Asai et al., 1995). El otro anisero contra el OCTA, se obtuvo de los Laboratorios Península con características de afinidad y especificidad controlada. Se utilizó la técnica indirecta de inmunofluorescencia de Coons (1958) (fig. 5) con el siguiente protocolo:

-Después de haber cortado el tejido.

-Se secaron las preparaciones por 30 min.

-Se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos salino (0.1M, pH 7.4) con 0.3% de Tritón X-100 por 10 min.

-Se incubaron con los anticuerpos (anti-LE, anti-ME y anti-OCTA), en una cámara húmeda a 4°C por 24h. Las diluciones utilizadas para cada anticuerpo se muestran en la tabla VIII.

-Se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (0.1M, pH 7.4) por 10 min.

-Se incubaron con el segundo anticuerpo (2º AC) en una cámara húmeda a 37 °C por 24 h (IGg hecho en cabra contra conejo y conjugado a isotiocianato de fluoresceína o rodamina, Lab. ICN) en diluciones de 1:50 y 1:100 (tabla VIII).

-Se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos 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^{-4} M) de su

Tabla VIII. Las diferentes diluciones de los anticuerpos LE, ME, OCTA y 2^o AC ; utilizadas en cada una de las muestras

Día	[LE]	[ME]	[OCTA]	[2^o AC]
10	1:50 , 1:100	1:25, 1:50	1:25, 1:100	1:100
12	1:50	1:50	1:50	1:50, 1:100
14	1:50	1:50	1:50	1:50, 1:100
15	1:50	1:50	1:50	1:50
16	1:50	1:50	1:50	1:50
20	1:50	1:50	1:50	1:50
22	1:50 , 1:25	1:50 , 1:25	1:50 , 1:25	1:50, 1:100
26	1:50	1:50	1:50	1:50, 1:100
28	1:50	1:50	1:50	1:50
30	1:50	1:50	1:50	1:50
33	1:100	1:50	1:50, 1:100	1:50, 1:100
38	1:50	1:50	1:50	1:50
45	1:50	1:50	1:50	1:50
49	1:100	1:50	1:100	1:50, 1:100
53	1:50	1:50	1:50	1:50, 1:100
60	1:50	1:50	1:50	1:50, 1:100
90	1:50	1:50	1:50	1:50
180	1:50	1:50	1:50	1:50

péptido sintético específico, d) control PBS (el experimento se corrió únicamente con PBS tritón para observar la fluorescencia nativa). 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.

El análisis de las preparaciones se realizó en un microscopio Leitz, Laborlux 12 equipado con una lámpara de vapor de mercurio de 50 W y un bloque de filtros para isotiocianato de fluoresceína. Se tomaron fotomicrografías en color con película Ektachrome 400, y en blanco y negro con película tri-X pan 400 ASA.

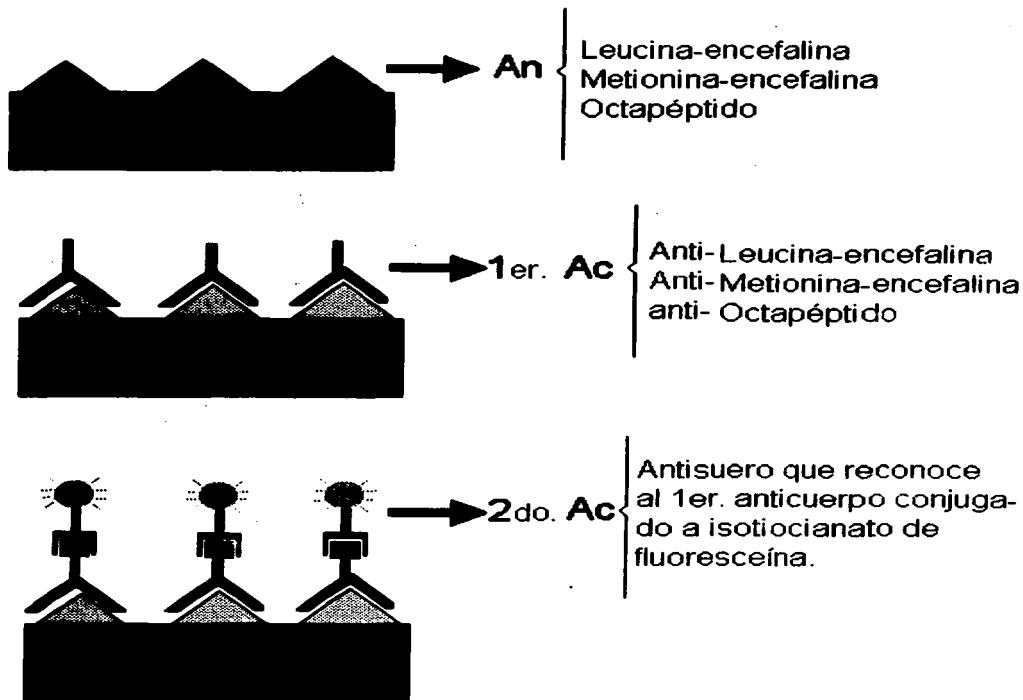


Fig. 5. Esquema donde se muestran los pasos de la técnica indirecta de inmunofluorescencia.

RESULTADOS

Los resultados se presentaran en el siguiente orden: primero, los correspondientes a la obtención de los huevos fértiles, por ovoposición natural y por fertilización *in vitro*; segundo, los relacionados con el estudio histológico y tercero, los resultados del estudio inmunohistoquímico.

Para este proyecto se utilizaron un total de 22 parejas de ajolotes. Diez parejas para las ovoposiciones naturales y doce para los experimentos de fertilización *in vitro*, de los cuales, se sacrificaron 4 machos para los experimentos de fertilización y los restantes quedaron como pie de cría. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Resultados de los experimentos de fertilización *in vitro*

Se realizaron 12 experimentos de fertilización *in vitro* donde se utilizaron 22 ajolotes (12 hembras y 10 machos). Los 6 primeros experimentos fueron la base para la estandarización del método de fertilización *in vitro*, el cual se utilizó en los experimentos 8, 10 y 12 (ver tablas IX y X).

En los cuatro experimentos donde se utilizaron las hormonas FSH y LH, tanto la comercial (FSH (Sigma) y LH (Sigma)) como la donada por la asociación Animal Hormone Program (USDA o-FSH-18 y USDA bLH-6), no hubo respuesta a la inducción de la ovoposición, ni a la liberación del espermátforo con las dosis y vía de administración utilizadas (ver tablas IX y X).

La dosis de la hormona GCH fue de 250 a 600 UI, dependiendo de la época del año, ya que cerca de la temporada de reproducción (invierno-primavera) responde con dosis bajas (250 UI), mientras que fuera de esta temporada responde a dosis altas (600 UI).

En siete experimentos se inició la puesta de huevos con un retraso de 12 h. En 4 de estos experimentos no se llevó a cabo la fertilización, porque la ovoposición se retrasó y los huevos deben ser colectados a los 20 min. después de la puesta, ya que la hidratación de la cubierta del huevo interfiere con la fertilización. En dos experimentos la ovoposición se inició a las 24 h posteriores a la inyección (ver tablas IX y X).

En los experimentos donde los conductos deferentes se maceraron, la movilidad de los espermatozoides duró 2 h. En los que se mantuvieron enteros duró de 12 a 24 h la viabilidad de los espermatozoides. No hubo diferencias en la viabilidad de los espermatozoides con los dos medios de cultivo utilizados (sol. de Steinberg y sol. de Ringer normal para rana, ver apartado de materiales y método).

El número de huevos que se obtuvieron en cada una de las puestas fue de entre 600 y 1000 huevos. Y en los dos últimos experimentos (tabla X, 10 y 12), donde se empleó el método estandarizado, se obtuvo un total de 650 y 1000 huevos de los cuales 48 y 30 fueron fértiles (ver tablas IX y X). Estos se procesaron para los experimentos de inmunohistoquímica.

A partir del experimento 6 se estandarizó un método de fertilización *in vitro* (ver sección de materiales y método), el cual se empleó en los experimentos 8, 10 y 12 (tabla X).

Ovoposición natural

De las 10 parejas de ajolotes que se formaron para la reproducción natural en condiciones del laboratorio se obtuvieron nueve ovoposiciones, donde el 90 % de los huevos fueron fértiles. De estos huevos se tomaron las muestras y se procesaron como se planteó en materiales y método.

RESULTADOS HISTOLOGICOS

Las muestras de los diferentes días de desarrollo se procesaron histológicamente, se obtuvieron los esquemas que sirvieron para el mapeo de la distribución de las estructuras inmunorreactivas (Figs. 7 y 8).

RESULTADOS INMUNOHISTOQUIMICOS

Para el estudio inmunohistoquímico se procesaron las muestras de los días (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 20, 22, 26, 28, 30, 33, 38, 45, 49, 53, 60, 90 y 180 días) fijadas en paraformaldehído al 4%, de cada una se cortaron 3 ejemplares.

La identificación de las diferentes estructuras y núcleos cerebrales se hizo comparativamente con las del adulto del atlas del *A. tigrinum* de Herrick, J. (1917) y otros trabajos neuroanatómicos de dos especies de salamandras: *Pleurodeles waltlii* y *Triturus alpestris* (González y col., 1995; Naujo-Manteural y col., 1994). Ya que no se cuenta con un atlas del desarrollo del *A. mexicanum*.

La identificación de neuronas y fibras inmunorreactivas (**NIR** y **FIR**) se realizó en cortes corónales y parasagitales de 15 μm de espesor.

La densidad de fibras se menciona cualitativamente como: escasa, media y alta en la **figura 6** se ejemplifican estos parámetros.

Los resultados inmunohistoquímicos mostraron lo siguiente:

Tabla IX. Experimentos de fertilización *in vitro*

No. de experimento	No. de animales ♀ ♂	Hormona	Dosis (UI)	No. de ♀ que respondieron	No. de ♂ utilizados	Total de huevos	Observaciones
1	1 1	GCH	250	1	0	----	-Ovoposición a las 24h. -Huevos no contabilizados -Ningún huevo fértil.
2	2 2	GCH	250 350	1 0	0	----	-Ovoposición a las 24h. -Huevos no contabilizados -Ningún huevo fértil.
3	1 1	FSH + LH	700 550	0	0	----	-No hubo respuesta a la estimulación hormonal -No hubo liberación del espermatofores -Ningún huevo fértil.
4	1 1	GCH	250	1	0	----	-Ovoposición a las 24 h -Huevos no contabilizados -Ningún huevo fértil.
5	4 4	GCH	600	2	0	655	-Ovoposición a las 24h -Respondieron 2 hembras
6	6 2	GCH	600	4	0	740	-Ovoposición a las 36h -Respondieron 4 hembras -Ningún huevo fértil.

Tabla X. Experimentos de fertilización *in vitro*

No. de experimento	No. de animales ♀ ♂	Hormona	Dosis (UI)	No. de ♀ que respondieron	No. de ♂ utilizados	Total de huevos	Observaciones
7	5 2	GCH	600	3	1	450	-Ovoposición a las 24 h. -Los conductos deferentes se macraron -Ningún huevo fertilizado
8	4 2	GCH	600	1	1	325	-Ovoposición a las 36 h. -Los conductos deferentes se cortaron en trozos -2 huevos fertilizados <i>in vitro</i> .
9	4 3	oFSH* + bLH*	80 5.3	0	0	0	-Se utilizaron los hormonas donadas por la *USDA-AHP. -No hubo respuesta a la estimulación hormonal.
10	4 3	GCH	600	3	1	650	-Ovoposición a las 36 h. -Los conductos deferentes se dejaron enteros -48 huevos fertilizados <i>in vitro</i> .
11	1 1	oFSH* + bLH*	400 5.3	0	0	0	-Se utilizaron los hormonas donadas por la *USDA-AHP. -No hubo respuesta a la estimulación hormonal.
12	4 2	GCH	600	3	1	1000	-Ovoposición a las 36 h. -Los conductos deferentes se dejaron enteros. -30 huevos fertilizados <i>in vitro</i> .

Estadios embrionarios

Esta parte del muestreo, según las tablas de desarrollo de Schrekenberg y Jacobson, comprende desde la fertilización hasta la etapa 41-42 (10 días de edad) (ver anexo II). Nuestro muestreo fue a partir de la etapa 13 (56 hrs. después de la primera división) que es donde inicia la nerulación. Los resultados mostraron lo siguiente:

Etapa 13 (56 h) hasta los 9 días

En los embriones de la etapa 13 hasta el día 9 del desarrollo ninguna estructura cerebral presentó inmunorreactividad a LE, ME y OCTA aún probando diferentes diluciones de los anticuerpos: LE 1:50 y 1:50, ME 1:25 y 1:50; y OCTA 1:50 y 100, además de diferentes tiempos de incubación, de 24 h. a 48 h, del primer anticuerpo.

Día 10

Este día corresponde, según las tablas de Schrekenberg y Jacobson, a la etapa 41-42 en donde el cerebro presenta un ligero encorvamiento y algunas estructuras no han terminado su formación (por ej. el telencéfalo). La larva tiene un tamaño de 9 mm. y comienza a moverse dentro del huevo. En esta etapa ninguna estructura cerebral presentó inmunorreactividad a los tres anticuerpos probados con la dilución de 1:50.

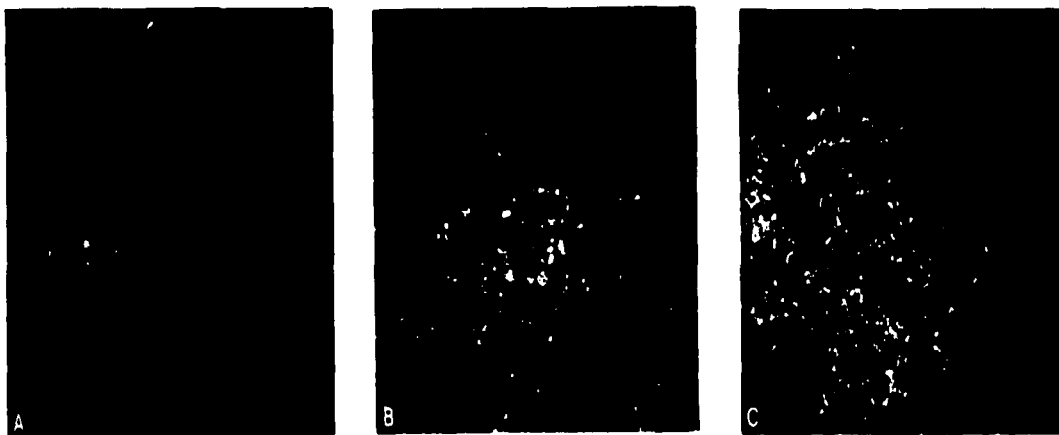


Fig. 6. Fotomicrografías de cortes coronales del cerebro del *A. mexicanum*, donde se ejemplifican los parámetros utilizados para valorar cualitativamente la densidad de las FIR; A) escasa, B) media y C) alta. Aumento: 250X.

Período larval

Día 11

En este día las larvas tienen un tamaño de 11 mm. y aún no presentan extremidades anteriores. De las tres larvas que se procesaron, únicamente un experimento presentó fibras inmunorreactivas con una densidad media que se localizaron en los núcleos paraventriculares hipotalámicos.

Día 12

En este día la larva tiene un tamaño de 11.5 mm. en esta etapa el telencéfalo no se ha terminado de formar y presenta todavía una curvatura ventral. En esta etapa se observaron las primeras estructuras inmunorreactivas a los anticuerpos probados.

En el telencéfalo dentro del núcleo estriamigdalino (NEAm) se encontró una densidad escasa de fibras inmunorreactivas (FIR) a LE (fig. 9, a y fig. 7, 12d-6). En el diencéfalo rostral se encontró una densidad escasa de fibras inmunorreactivas a LE, ME y a OCTA dentro del núcleo preóptico (NPO) (fig. 10,c y fig. 7, 12d-7), tálamo ventral (PvT) (fig. 9,f; fig. 10,c y fig. 7, 12d-7), núcleos paraventriculares hipotalámicos (NPvHt) (fig. 9,f; fig. 11,b y fig. 7, 12d-9), tegmentum dorsal (TgD) y tegmentum ístmico (TgIs) (fig. 7, 12d-11,12,13) y en la zona motora del rombencéfalo (ZM) (fig. 7, 12d-17). El hipotálamo (Ht) presentó FIR con una densidad escasa (fig. 11,f) a OCTA y una densidad media a ME y LE (fig. 10, i; fig. 7,12d-11,12,13,14 y 15) (ver tablas XII, XIII y XIV).

Día 14

En este día las larvas tienen un tamaño de 12.5 mm. y se inicia la eclosión. En la parte ventral del diencéfalo y rombencéfalo se presentaron fibras inmunorreactivas a **LE**, **ME** con una densidad media y a **OCTA** con una densidad escasa.

En el telencéfalo se encontraron **FIR** con una densidad escasa a **LE** y **ME** localizadas en los núcleos septales (**NS**) (fig. 7, 14d-5), comisura anterior (**CA**). En el diencéfalo dentro del **NPo**, **PvT**, **NPvHt** (fig. 7, 14d-6,8,9,10,11) y en el mesencéfalo dentro del **TgD** y **TgIs** se localizó una densidad escasa de **FIR** a **LE**, **ME** (fig. 7, 14d-12,13). En la **PvT** y en los **NPvHt** tuvieron una densidad media de **FIR** a **ME** (fig. 7, 14d-8,9,10,11). En el rombencéfalo las fibras inmunorreactivas a **LE** y **ME** se localizaron en la **ZM** con una densidad escasa (fig. 7, 14d-15). La inmunorreactividad a **OCTA** se localizó en el diencéfalo en los mismos núcleos que **LE** y **ME** con una densidad escasa (fig. 7, 14d-8,9,10,11) (ver tablas XII, XIII y XIV).

Día 15

En este día la larva tiene un tamaño de 13 mm.. La mayoría de las larvas han eclosionado y empiezan a alimentarse con pequeños crustáceos. La inmunorreactividad a **ME**, **LE** y **OCTA** se encontró en fibras con una localización similar al día 14, es decir **FIR** en los **NPvHt**, en el **TgD** y **TgIs** y en el hipotálamo (**Ht**). **ME** presentó con una densidad mayor de **FIR** y **OCTA** con una densidad escasa (ver tablas XII, XIII y XIV).

Día 16

En este día la larva tiene un tamaño de 13.5 mm, aún no presenta extremidades. En el telencéfalo se localizó una densidad escasa de **FIR** a **LE** y **ME** en el **NS**, núcleo acumbens (**NAc**) y

NAm, mientras que en la comisura hipocampal (**CHp**) y anterior (**CA**) se observó una densidad media de **FIR a ME** (fig. 7, 16d-4,5,6). En el diencéfalo se encontró una densidad escasa de **FIR a LE** y a **OCTA** en el **NPo**, y en el **PvT**, mientras que para **ME** tuvo una densidad media (fig. 7, 16d-6). El **NPvHt** mostró una densidad media de **FIR a LE**, **ME** y una escasa para **OCTA** y el **Ht** una densidad media para **LE** y **OCTA** y una alta para **ME** (fig. 9,g) (fig. 7, 16d-4,5,6). El mesencéfalo presentó una densidad escasa de **FIR a LE** y **OCTA** y una densidad media **ME** en el **TgD** e en el **Tgls** (fig. 7, 16d-9,10,11,12). En la **ZM** del rombencéfalo la densidad de **FIR a LE** fue escasa (fig. 9, m) y **ME** fue media, además de una densidad media de **FIR a ME** en la formación reticular (fig. 7, 16d-13,14) (ver tablas XII, XIII y XIV).

Día 20

En el día 20 la larva tienen un tamaño de 15 mm. En el telencéfalo no se encontró inmunorreactividad a los anticuerpos probados. En el diencéfalo se localizó una densidad escasa de **FIR a LE** y **OCTA** en el **PvT** e **Ht**, mientras que para **ME** la densidad de **FIR** fue media (fig. 7, 20d-6). El **NPo** presento una densidad escasa de **FIR a LE** y **ME** y el **NPvHt** presentó una densidad media de **FIR a LE** y **ME** (fig. 7, 20d-3,4,5). En el **Tgls** presentó una densidad escasas de **FIR a ME** y una densidad media de **FIR a LE** y **ME** en el **TgD** (fig. 7, 20d-4,5,6). En la **ZM** del rombencéfalo se encontró una densidad escasa de **FIR a LE** y **ME** (fig. 7, 16d-8,9) (ver tablas XII, XIII y XIV).

Día 22

El día 22 mostró en el **NS** del telencéfalo una densidad escasa de **FIR a LE**, **ME** y **OCTA** (fig. 7, 22d-3,4). En el **NPo**, **PvT**, **Ht**, **TgD** y **Tgls** del diencéfalo y mesencéfalo se localizó una densidad escasa de **FIR a LE** y **OCTA** y para **ME** la densidad fue media y alta en el **NPvHt** (fig.

9, h; fig. 10,i; fig. 11,c; fig. 7, 22d). En el rombencéfalo la densidad para LE y ME fue escasa y se localizó en la ZM (fig. 10,o) (fig. 7, 16d-13) (ver tablas XII, XIII y XIV).

Día 26 y 28

En estos días la larvas tienen un tamaño de 16 mm., y presenta brotes de las extremidades anteriores. Se observó una densidad escasa de FIR a LE y ME en el NS, TgD y Tgls y una densidad media en el NPvHt y Ht (fig. 7, 26d-3,4,5,6,7,8,9). En el NPo y PvT presentaron una densidad media de FIR a ME (fig. 7, 26d-4,6,7). En el rombencéfalo se siguió viendo una densidad escasa de FIR a ME y LE dentro de la ZM (fig. 7, 26d-11,12,13). La densidad de FIR a OCTA en los núcleos del diencéfalo y en el TgD fue escasa (fig. 7, 26d-8). En el día 28 la distribución de la inmunorreactividad no cambia únicamente se presenta una ligera densidad de FIR a LE en el núcleo estriado y en el PvT (fig. 7, 28d).

Día 30

La larva tiene un tamaño de 18 mm. Las extremidades anteriores siguen desarrollándose y las branquias están más arborizadas. Hay un ligero aumento en la densidad de FIR y de áreas que las presentan (tabla XII, XIII y XIV). Se encontró una densidad media de FIR a LE, ME y OCTA en la comisura hipotalámica y anterior (CHp, CA), además aparecen las primeras neuronas inmunorreactivas (NIR) a ME, en grupos pequeños (2-3 neuronas por corte), localizadas en el NPvHt e Ht, además de una densidad alta de FIR (fig. 8, 30d). En la ZM del rombencéfalo presentó una densidad escasa de FIR a OCTA (fig. 8, 30d).

Día 33 y 38

La larva tiene un tamaño de 18.5 mm. y están formadas las extremidades anteriores. En el día 33 se observaron grupos de neuronas inmunorreactivas (2 NIR por grupo y por corte) a ME y

una densidad mayor de fibras que en las etapas anteriores (fig. 10; f,k,l). La distribución de fibras inmunorreactivas fue desde el telencéfalo hasta el rombencéfalo. Las FIR a ME se distribuyeron en el NAM, cuerpo estriado (CE) y núcleo caudado (NC) con una densidad escasa. En el diencéfalo se encontró una densidad alta de FIR a ME en NPvHt y en el Ht (fig.10; f,k,l), mientras que para LE y OCTA fue ligera (fig. 7, 33d-3,4,5,6,7,8,9). El día 38 presentó una similar distribución de inmunorreactividad que el día 33 con la diferencia de que hay NIR a LE y a OCTA en el Ht con una densidad ligera de FIR. El rombencéfalo mostró una densidad ligera de FIR a LE y ME (fig. 7, 38d).

Día 45 y 49

En estos días hubo un ligero incremento en la densidad de fibras y el número de neuronas inmunorreactivas a LE, ME y OCTA, localizadas principalmente en la parte ventral del cerebro. La distribución por regiones de FIR y NIR fue similar para los tres antisueros LE, ME y OCTA (ver tablas XII, XIII y XIV) (fig. 7, 45 y 49d). En el telencéfalo se encontró una densidad media de FIR para LE y ME en el NAc, NAM, CA, CHp (fig. 7; 45d-4,5,6,7,8). OCTA únicamente presentó una densidad escasa de FIR en la CA y una media en la CHp. En el diencéfalo se encontró una mayor densidad de FIR a LE, ME y OCTA, además de la presencia de NIR a LE y ME en el NPvHt (fig. 9,i) (fig. 7; 45d-10,11,12). Al igual que en la etapa anterior, el rombencéfalo, dentro de la zona motora, presentó una densidad escasa de FIR. En el Ht las NIR a LE, ME y OCTA se presentaron aisladas (fig. 7; 45d-13,14) y en grupos de 2 a 3 neuronas por corte (fig. 11,m) (fig. 7, 45d-13,14) y también el NPvHt presentó NIR a ME (fig. 7; 45d-10,11,12) (fig. 10, 49d).

Día 53

En este día la larva tiene un tamaño de 19 mm. La inmunorreactividad a los anticuerpos probados (LE, ME y OCTA) se localizó principalmente en los núcleos diencefálicos. En el núcleo

paraventricular hipotalámico (NPvHt) y en el hipotálamo (Ht) se encontró una densidad alta de **FIR**, además de grupos de neuronas inmunorreactivas (**NIR**) (de 2 a 3 neuronas por corte) (fig. 9; j,n) (fig. 11; d,h,i) (fig. 7, 53d-11,12). En el mesencéfalo también se localizaron **FIR** a los tres anticuerpos con una densidad media en el tegmentum dorsal (**TgD**) y con una densidad escasa en el tegmentum istmico (**TgIs**) (fig. 7, 53d-13,14,15). En el rombencéfalo en la zona motora (**ZM**) se localizaron **FIR** con una densidad escasa (fig. 7, 53d-17).

Día 60

Las larvas tienen un tamaño 28 mm. Comienzan a desarrollarse las extremidades posteriores. La distribución de la inmunorreactividad (**IR**) aún se localizó en los mismos núcleos que en los días anteriores, pero con variaciones en la densidad (tabla XII, XIII y XIV). En los diferentes núcleos del telencéfalo (p ej. **NS**, **NAC**, **CHp**) la densidad de **FIR** a **LE** fue predominantemente escasa, mientras que para **ME** fue media (ver tabla XII, XIII y XIV) (fig. 8, 60d). **OCTA** únicamente presentó una densidad escasa de **FIR** en la **CA** y una media en la **CHp** respectivamente (fig. 8, 30d). En el diencéfalo se presentó una densidad alta de fibras y de neuronas **IR** a **ME** en **NPvHt** e **Ht** (de 2 a 3 neuronas por corte), mientras que para **LE** y **OCTA** fue media e igual con **NIR** en el **Ht** (de 2 a 3 neuronas por corte) (ver tablas XII, XIII y XIV) (fig. 10,g) (fig. 11,e). En el mesencéfalo se localizó en el **TgD** y **TgIs** una densidad media de **FIR** a **ME** y una densidad escasa para **LE** y **OCTA** (fig. 7, 60d-22,26). En el rombencéfalo la densidad de **FIR** a los tres anticuerpos fue escasa y se localizó en la **ZM** y **FR** (fig. 7, 60d-29,30) (fig. 8, 60d).

3 meses (90 días)

En este día las larvas tienen un tamaño de 4.6 cm y las extremidades posteriores ya están formadas. En el telencéfalo se encontró una densidad alta de **FIR** a **ME** y **LE** en la **CA** y una densidad media en la **CHp**. En los **NS**, **NAC**, **CE** y **NCA** una densidad escasa de **FIR** a **LE** y **ME**. **OCTA** presentó una densidad escasa de **FIR** en los **NS** y en la **CHp** y una densidad media en la

CA. En el diencéfalo se encontró una densidad media de **FIR a LE, ME y OCTA** en el **NPo, PvT, NPV** (excepto para **ME** que fue una densidad alta) y en el **Ht**, además de **NIR a LE y ME** en el **NPvHt e Ht**, **OCTA** únicamente presentó **NIR** en el **Ht**. En el mesencéfalo se localizó una densidad media de **FIR a LE y ME** en el **TgD** y en el **TgIs**, y una densidad escasa para **OCTA**. En la **ZM** del **ROM** la densidad de **FIR a los tres anticuerpos** fue escasa (ver tabla XII, XIII y XIV) (fig. 8, 90d).

6 meses (180 días)

En este día las larvas tienen un tamaño de 15 cm. de largo y el cerebro se encuentra bien formado. La densidad de neuronas y fibras inmunorreactivas presentó un aumento considerable en todo el cerebro. En el telencéfalo se encontró una densidad alta de **FIR a LE** (fig. 9,b) (fig. 11, a) y **ME** en el núcleo anterior del bulbo olfatorio (**NOA**), mientras que para **OCTA** fue ligera. En las regiones del palio (dorsal, piriforme e hipocampal) la densidad de **FIR a ME, LE y OCTA** osciló entre escasa y media (ver tablas XII, XIII, XIV) (fig. 8, 180d). Una densidad media de **FIR a LE, ME** se localizó en los **NS, NAc, CE, NAm y NA** (fig. 8, 180d). En la comisura anterior (**CA**) e hipocampal (**CHp**), la densidad de **FIR a ME, LE y OCTA** aumento de media a alta (fig. 9,d,e). El diencéfalo presentó una densidad media de **FIR a LE** en los núcleos habenules. En los **NPo, PvT, NPvHt e Ht** se encontró una densidad alta de **FIR a LE y ME** (fig. 9,k; fig. 10,h) (fig. 8,180d), mientras que para **OCTA** la densidad de **FIR** en estos núcleos osciló entre media y alta. Además, en el **NPo** se encontraron grupos pequeños de **NIR** (de 2 a 5 neuronas por corte) a **LE y ME** y en el **NPvHt e Ht** se localizaron grupos grandes de **NIR** (5 a 15 neuronas por corte) (fig. 9,k,l; fig. 10,h). En el mesencéfalo se encontró una densidad escasa de **FIR a ME y LE** en el tectum (**Tc**) y en cerebelo (**Cb**), una densidad media de **FIR a ME, LE y OCTA** en el **TgD**. En el **Is** la densidad de **FIR a ME, LE** fue alta, mientras que para **OCTA** fue media. En el rombencéfalo la densidad de **FIR a ME, LE y OCTA** se localizó en sus tres regiones **ZM, FR y ZS** (zona sensorial). La **ZM** presentó una densidad alta para **LE y ME**. La **FR** para los tres anticuerpos,

mostró una desidad media y la ZM, la densidad de FIR a ME y OCTA fue escasa. En una corte parasagital del cerebro la densidad de FIR a los tres anticuerpos se vio un incremento rostro-caudal, o sea que en la parte rostral del rombencéfalo la densidad era media y en la caudal era alta (fig. 9,m; fig. 10,p,q; fig. 11,k,l; fig. 8, 180d).

En las tablas XII, XIII y XIV se resumen los resultados de la distribución de la inmunorreactividad a LE, ME y OCTA en el desarrollo del SNC del *A. mexicanum*, y se hace una comparación con la distribución de estos tres péptidos con la del adulto.

Pruebas de preadsorción:

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

Para los controles de especificidad de los antisueros por preadsorción en condiciones inmunohistoquímicas se utilizaron las diluciones de trabajo de los antisueros: antisuero-LE 1:50 y 1:100, antisuero-ME 1:25 y 1:50; y antisuero-OCTA 1:50 y 1:100 y una concentración de antígeno, de 10^{-4} M (LE, ME y OCTA sintético). Estas pruebas en ninguna de las muestras incubadas con el anticuerpo con el péptido específico presentaron fluorescencia (tabla XI).

Tabla XI. Efecto de la preadsorción directa y cruzada de los antisueros de LE, ME y OCTA con los péptidos sintéticos LE, ME y OCTA homologos sobre la intensidad de la fluorescencia.

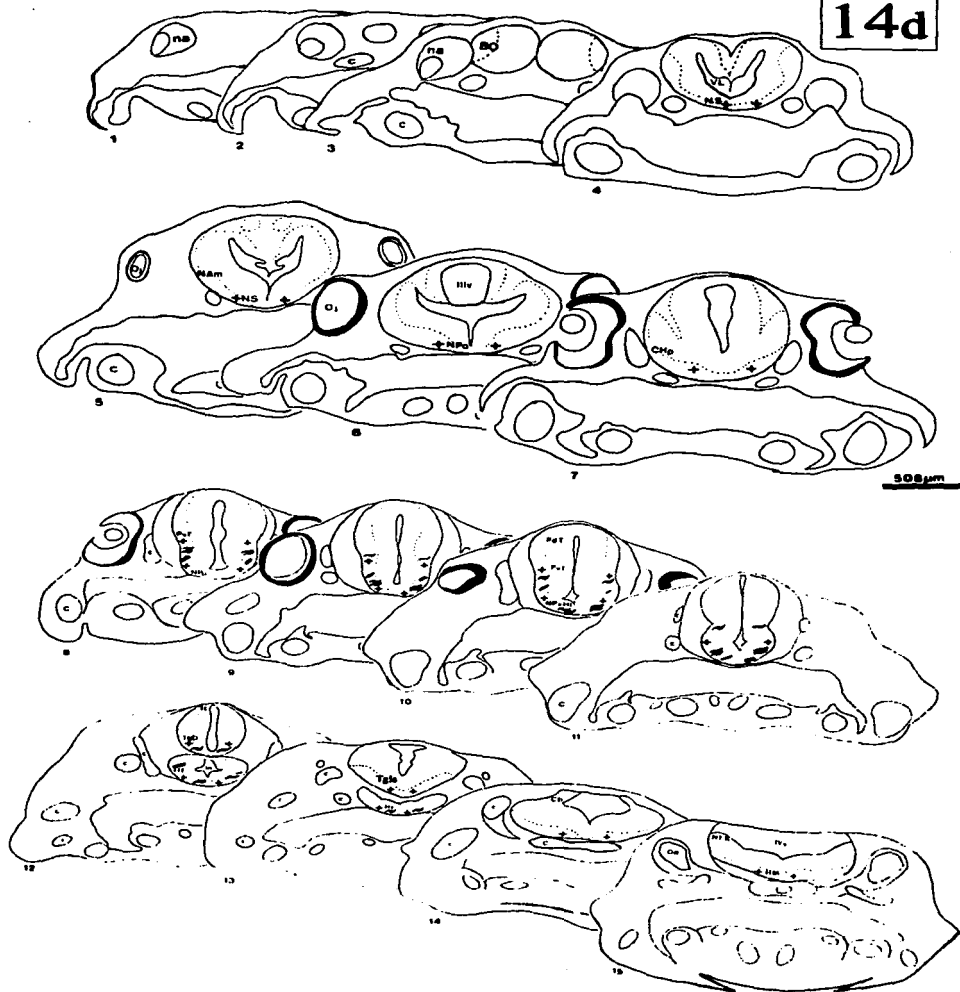
Antisuero	Péptido		
	LE	ME	OCTA
Anti-LE	---	+++	+++
Anti-ME	+++	---	+++
Anti-OCTA	+++	+++	---

Notación: ---, ausencia de fluorescencia; +++, máxima fluorescencia.

Fig. 7. Esquemas de cortes coronales del sistema nervioso central de las larvas del *Ambystoma mexicanum* de 12, 14, 16, 20, 22, 26, 28, 33, 38, 45, 49, 53 y 60 días de desarrollo. Se muestra la distribución de FIR y NIR a LE, ME y OCTA. La densidad de FIR valorada cualitativamente se representan como: escasa (+), media (++) y alta (+++) para LE; escasa (~), media (≈) y alta (≅) para ME y escasa (/), media (//), alta (///) para OCTA. Las NIR se muestran con (o) para LE, (•) para ME y (•*) para OCTA. La línea discontinua representa el límite entre la sustancia blanca y la sustancia gris.

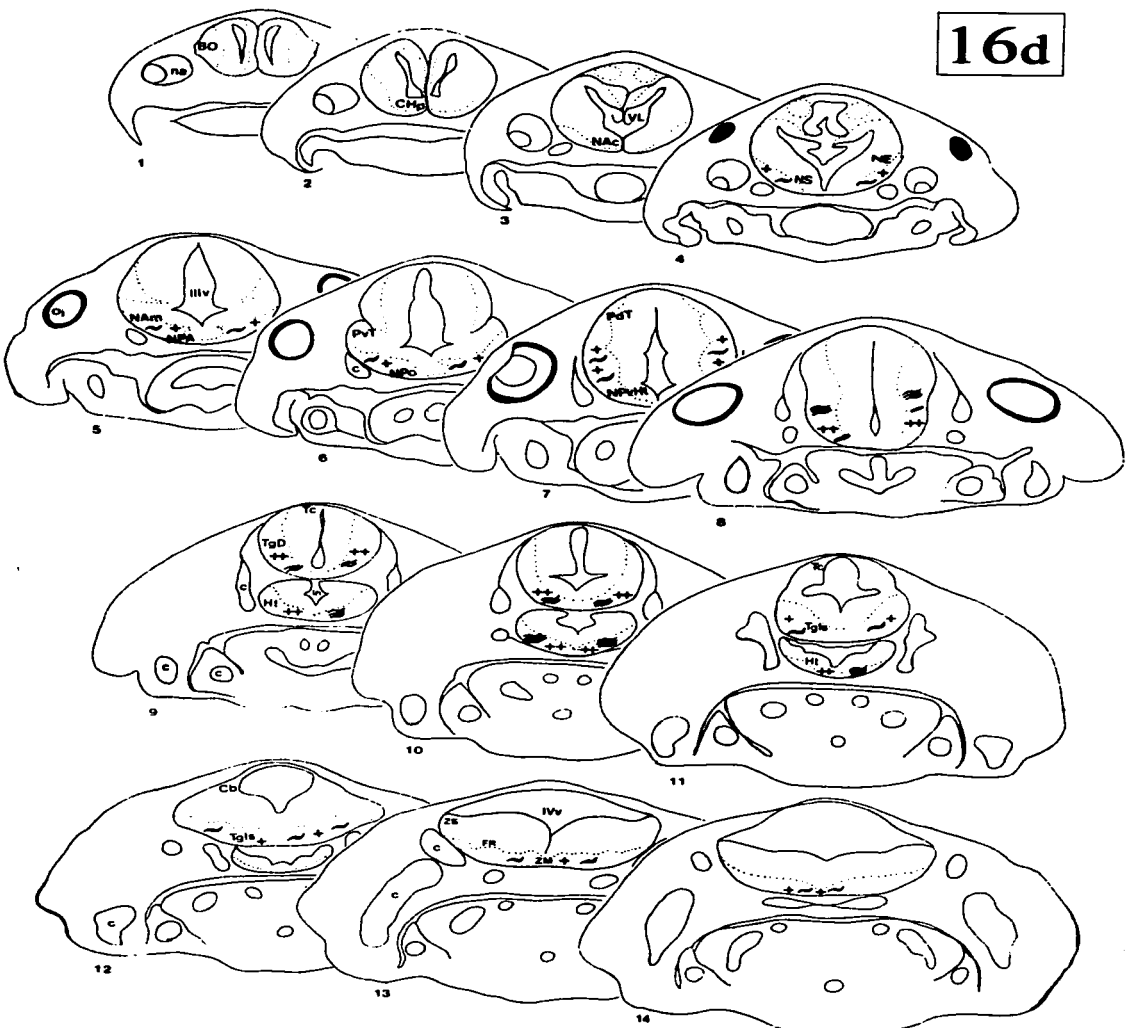
Abreviaciones: cartilago (C), canales semicirculares (CS), comisura anterior (CA), cerebelo (Cb), comisura hipocampo (CHp), cuarto ventrículo (IVv), eminencia media (EM), formación reticular (FR), ganglio del VIII par (GvVIII), habenula (Hb), hipófisis (Hp), hipotálamo (Ht), infundíbulo (Inf), médula oblongada (MO), nariz (na), notocorda (N), núcleo anterior olfatorio (NAO), núcleo amigdalino (NAa), núcleo estrado amigdalino (NEAa), núcleo fascicular solitario (NFS), núcleo reticular solitario (NRS), núcleo istmico (NI), núcleo preóptico (NPa), núcleo paraventricular hipotálamico (NPvH), núcleo septales (NS), palio dorsal (PD), parte ventral talámica (PvT), parte dorsal talámica (PdT), pedúnculo (Ped), pinal (P), oído (Oa), ojo (Oj), útero ventral (Tv), tectum (Te), tegmentum istmico (Tia), tegmentum dorsal (TdB), tegmentum ventral (TgV), rombencefalo (ROM), tercer ventrículo (IIIv), ventrículo lateral (VL), zona motora (ZM).

14d



Símbolos: NIR: LE (O), ME (●), OCTA (◐). FIR: LE (◑), ME (◒), OCTA (◓).

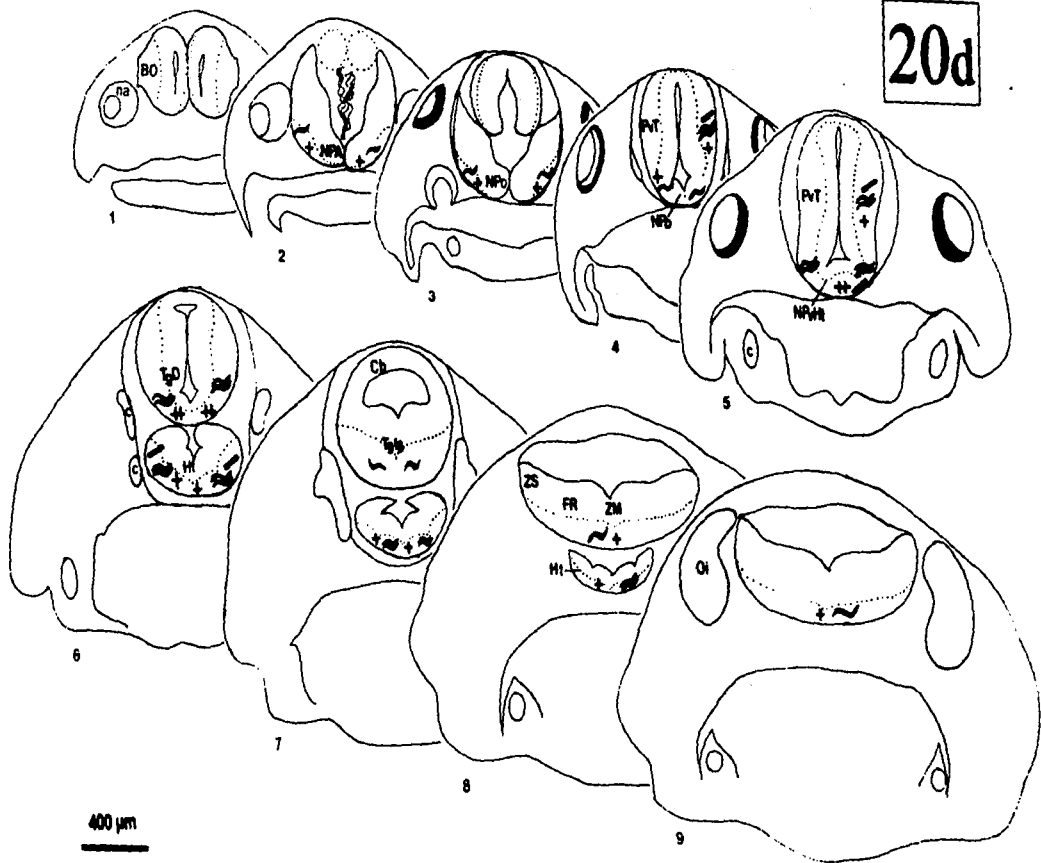
16d



Símbolos: NIR: LE (○), ME (●), OCTA (*). FIR: LE (+), ME (-), OCTA (◊).

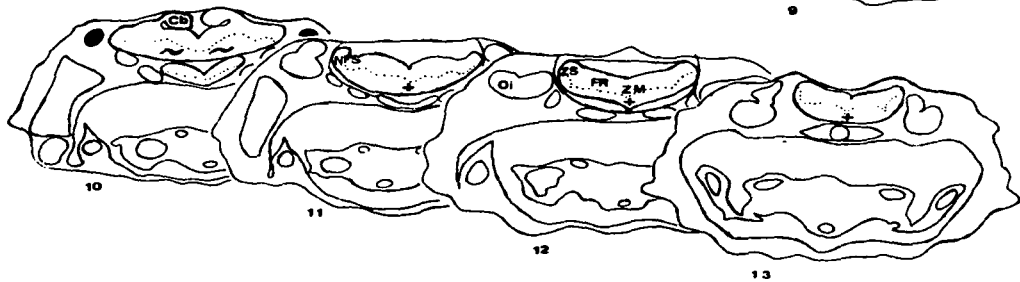
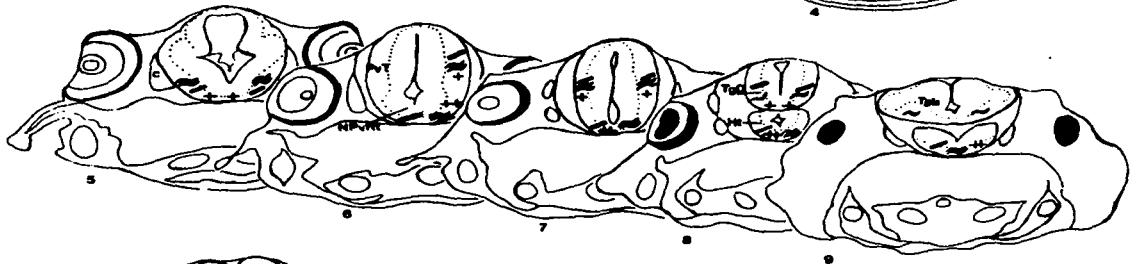
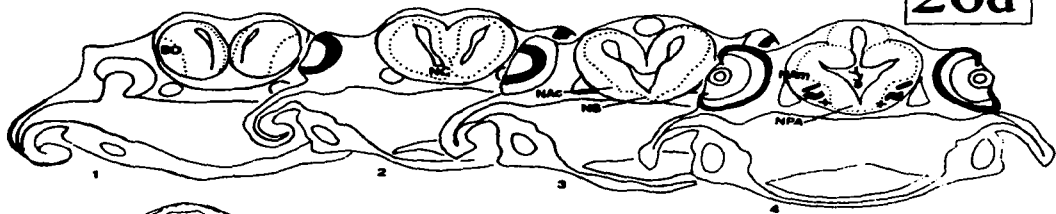
416 μm

20d



Simbolos: NVR: LE (o), ME (o), OCTA (+), VVR: LE (+), ME (-), OCTA (o).

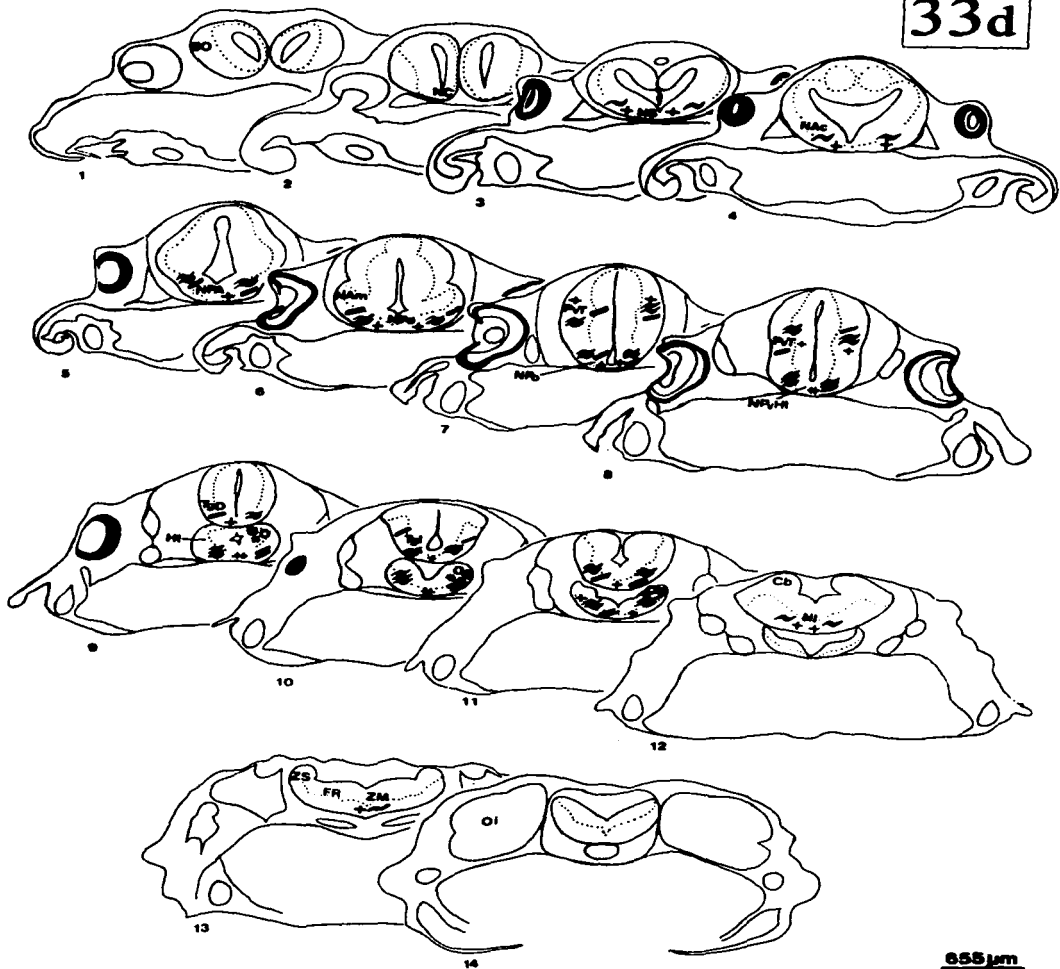
26d



632 μ m

Símbolos: NIR: LE (O), ME (●), OCTA (*). FIR: LE (+), ME (-), OCTA (∠).

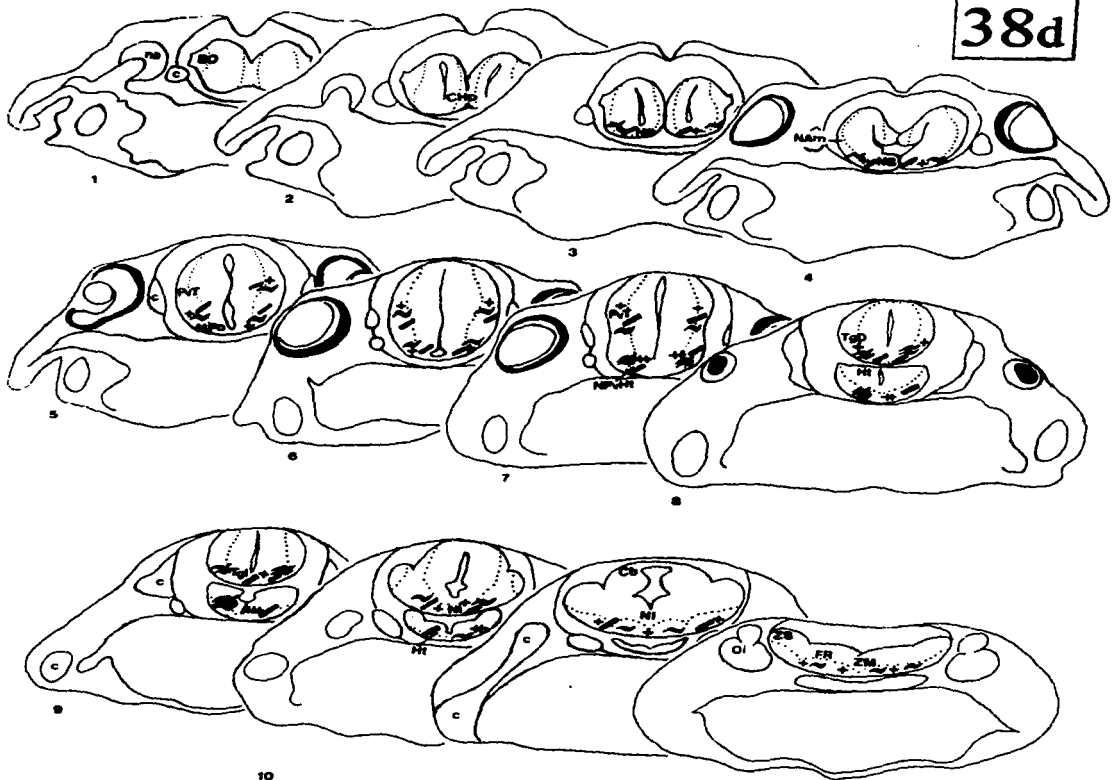
33d



0.58 μm

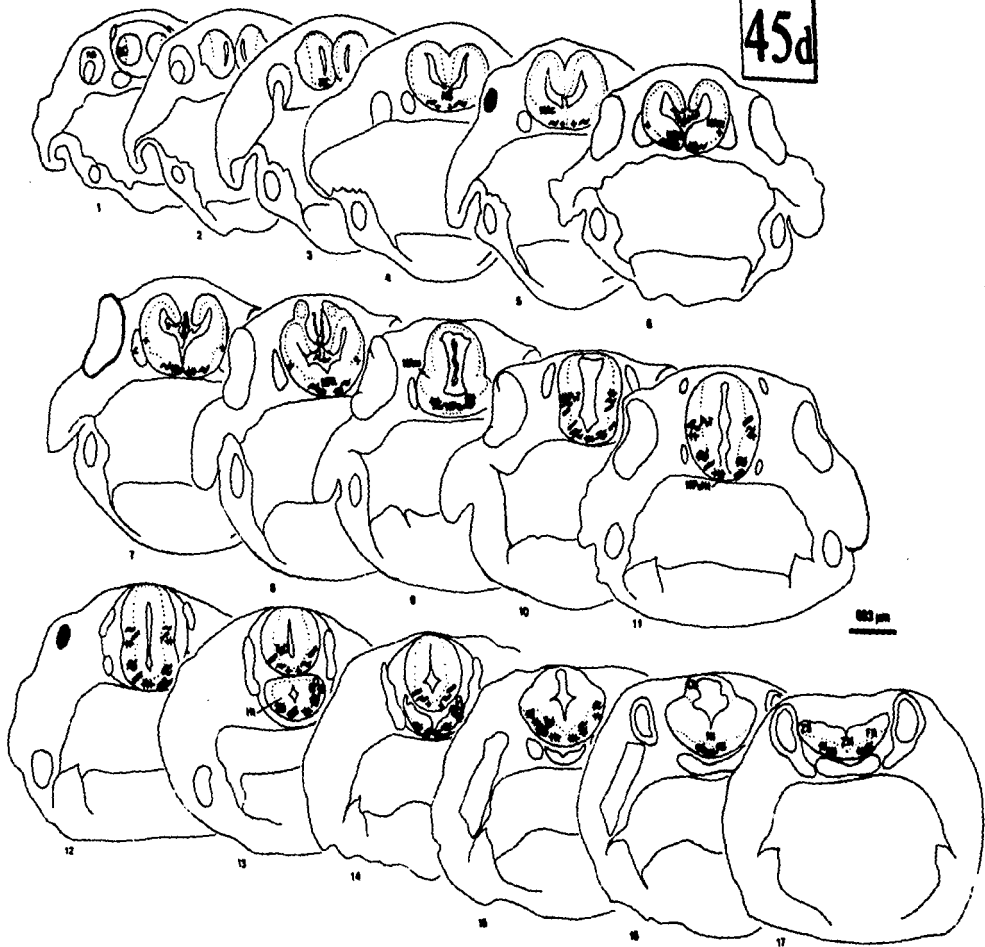
Símbolos: NIR: LE (O), ME (●), OCTA (◐). FIR: LE (+), ME (-), OCTA (◑).

38d



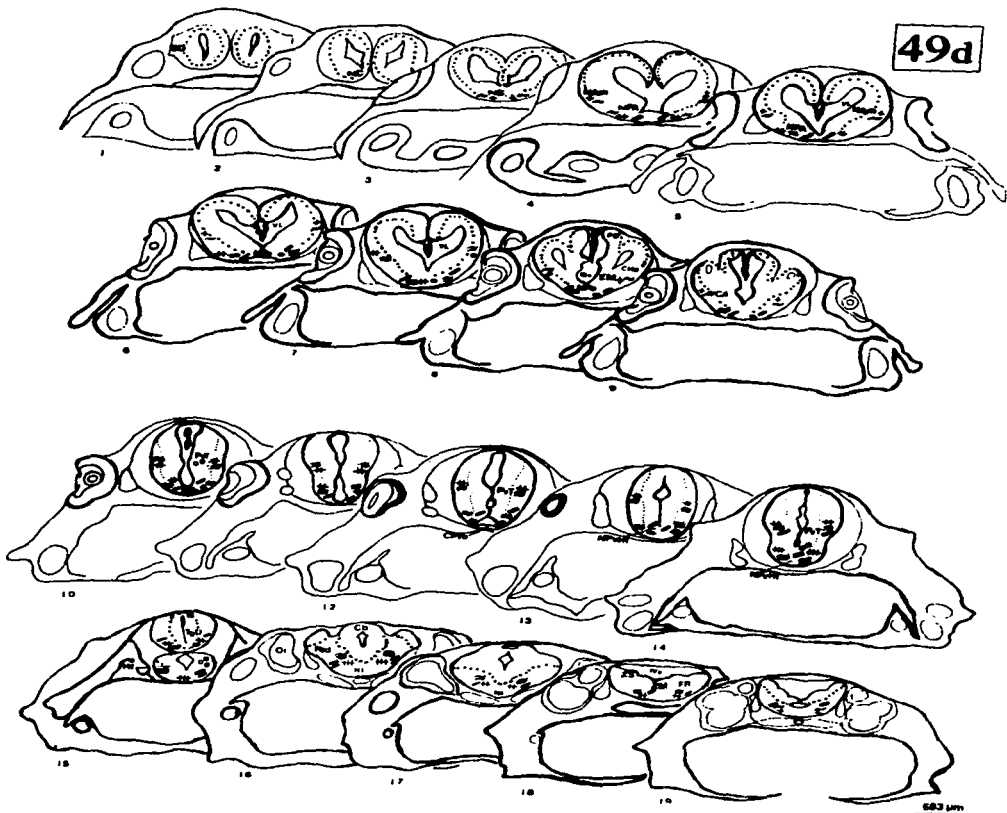
Simbolos: NIR: LE (O), ME (●), OCTA (°). FIR: LE (+), ME (-), OCTA (∠).

45d



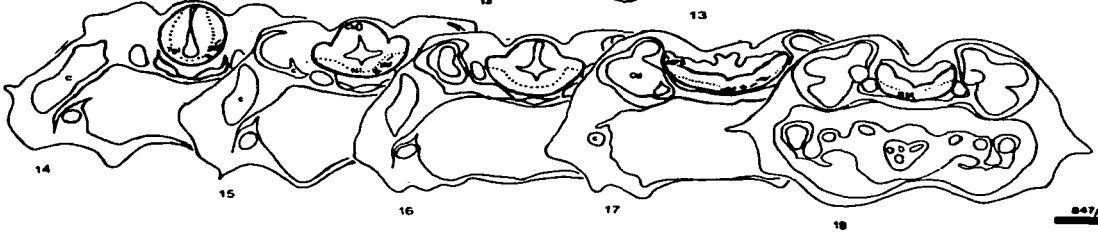
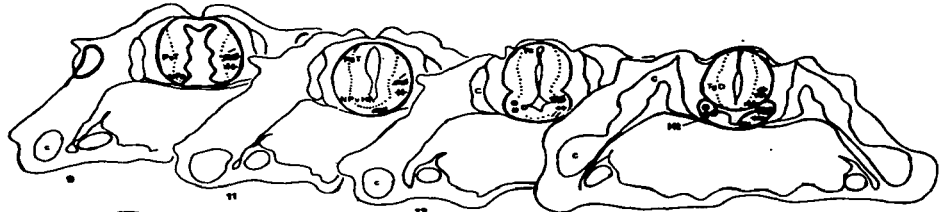
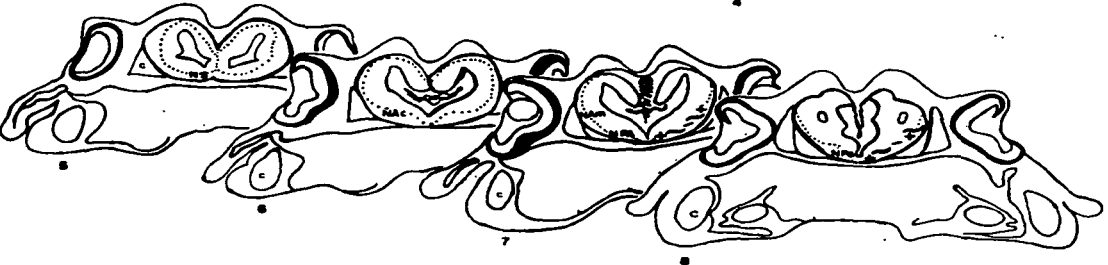
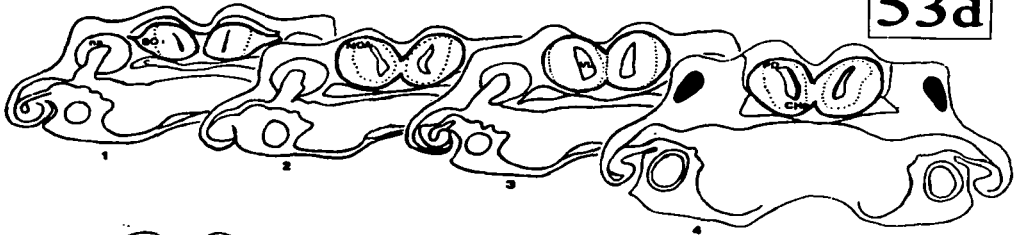
Símbolos: NIN: LE (O), ME (O), OCTA (O). VIR: LE (+), ME (-), OCTA (I).

49d



SIMBOLOGÍA: NIR: LE (O), ME (●), OCTA (◐) FIR: LE (+), ME (-), OCTA (◑)

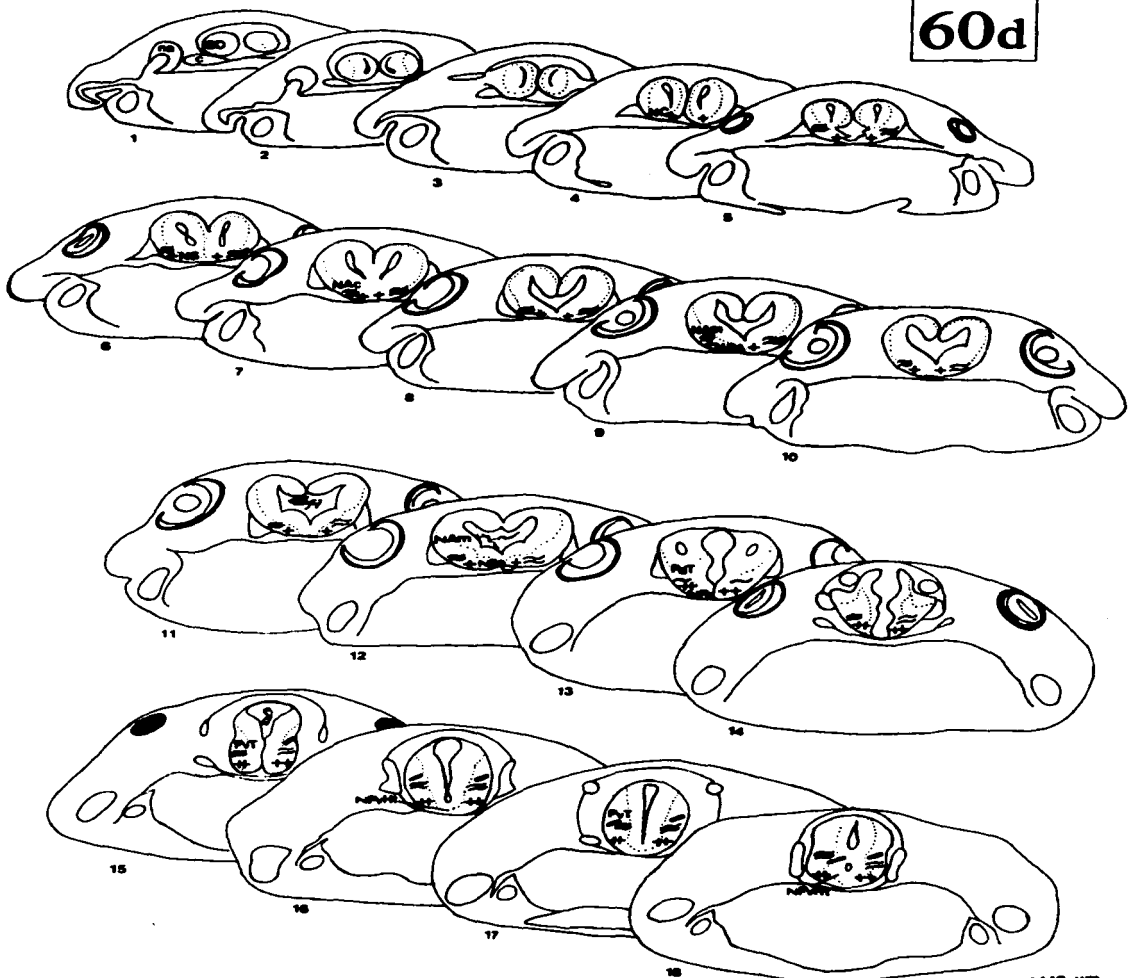
53d



047 μm

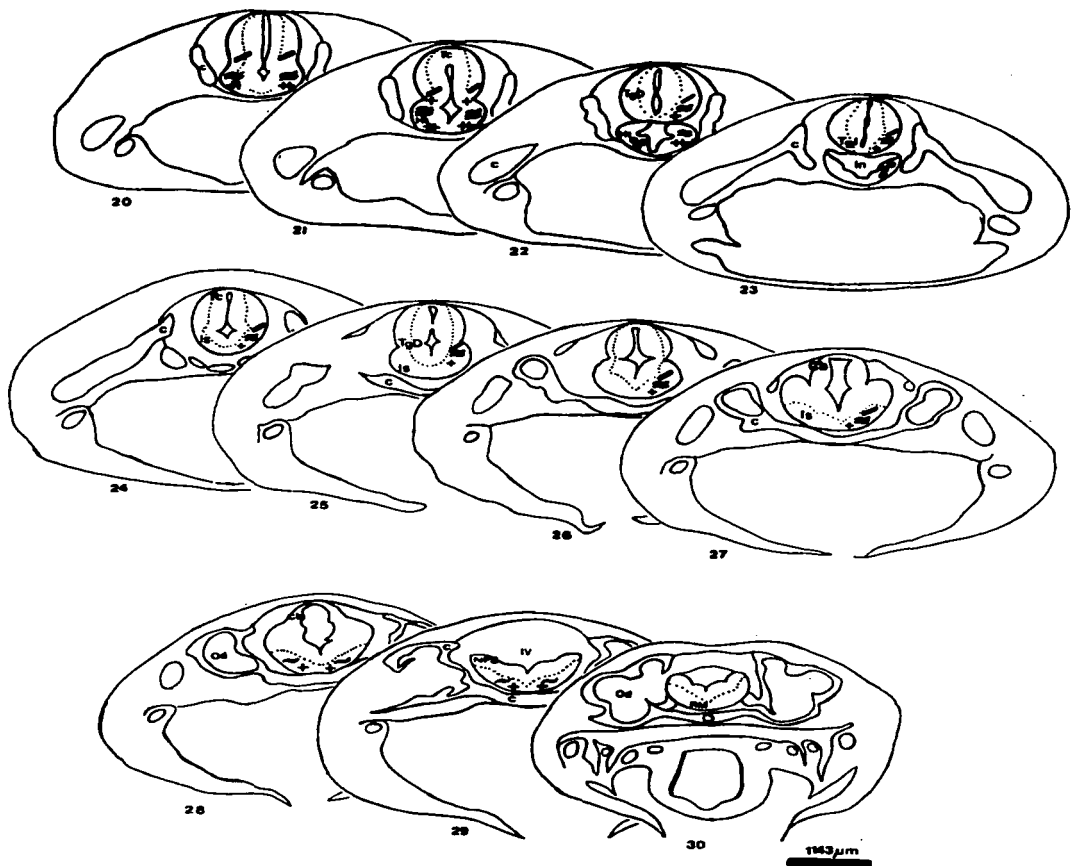
Símbolos: NIR: LE (O), ME (●), OCTA (°). FIR: LE (◄), ME (◄), OCTA (◄).

60d



Símbolos: NIR: LE (O), ME (●), OCTA (*). FIR: LE (+), ME (-), OCTA (∩).

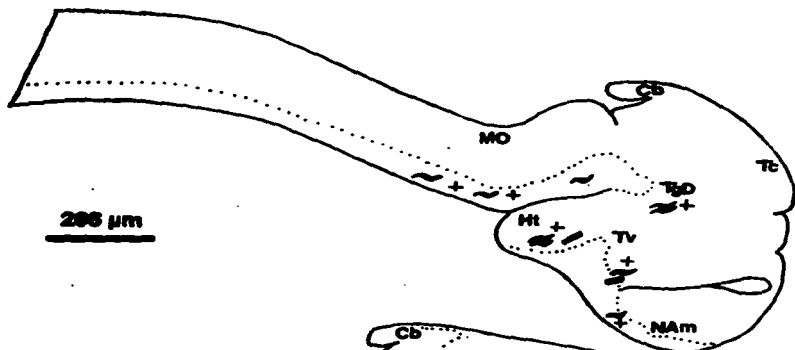
1443 μ m



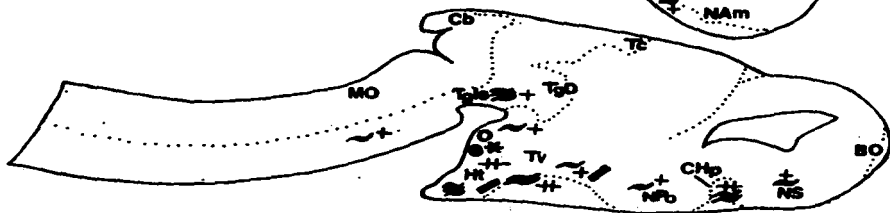
Simbolos: NIR: LE (O), ME (⊙), OCTA (*). FIR: LE (+), ME (-), OCTA (f).

Fig. 8. Esquemas de cortes parasagitales del sistema nervioso central de las larvas del *Ambystoma mexicanum* de 12, 30, 60, 90 y 180 días de desarrollo. Se muestra la distribución de FIR y NIR a LE, ME y OCTA. La densidad de FIR valorada cualitativamente se representan como: escasa (+), media (++) y alta (+++) para LE; escasa (~), media (=) y alta (≡) para ME y escasa (/), media (//), alta (///) para OCTA. Las NIR se muestran con (o) para LE, (e) para ME y (*) para OCTA. La línea discontinua representa el límite entre la sustancia blanca y la sustancia gris.

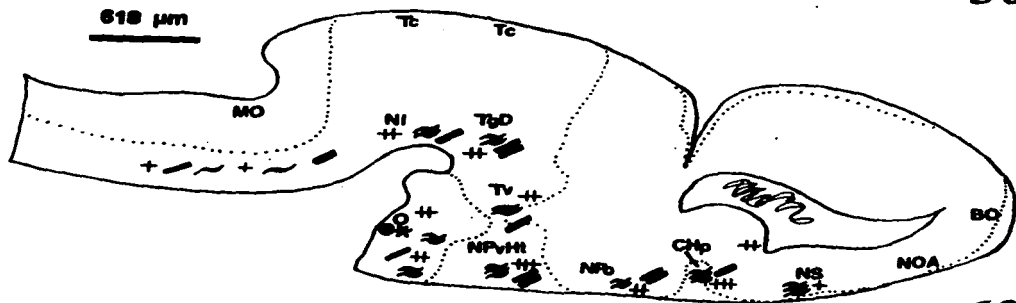
Abreviaciones: cartílago (C), canales semicirculares (CS), comisura anterior (CA), cerebelo (Cb), comisura hipocámpal (CHp), cuarto ventrículo (IVv), eminencia media (EMe), formación reticular (FR), ganglio del VIII par (GAVIII), habenula (Hb), hipófisis (Hp), hipotálamo (Ht), infundíbulo (In), médula oblongata (MO), nariz (na), notocorda (N), núcleo anterior olfatorio (NAO), núcleo amigdalino (NAa), núcleo anterior amigdalino (NAaA), núcleo fascicular solitario (NFS), núcleo reticular solitario (NRS), núcleo lúmico (NL), núcleo preóptico (NPo), núcleo paraventricular hipotálamico (NPvH), núcleos septales (NS), palio dorsal (PD), parte ventral talámica (PvT), parte dorsal talámica (PdT), pedúnculo (Ped), pínax (P), oído (Oe), ojo (Oj), tálamo ventral (Tv), tectum (Te), tegmentum lámbico (TgLa), tegmentum dorsal (TgD), tegmentum ventral (TgV), rombencéfalo (ROM), tercer ventrículo (TV), ventrículo lateral (VL), zona motora (ZM).



12 d

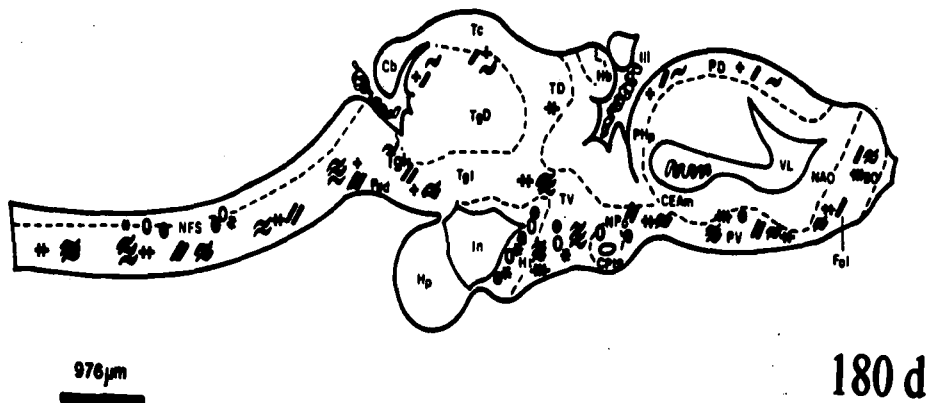
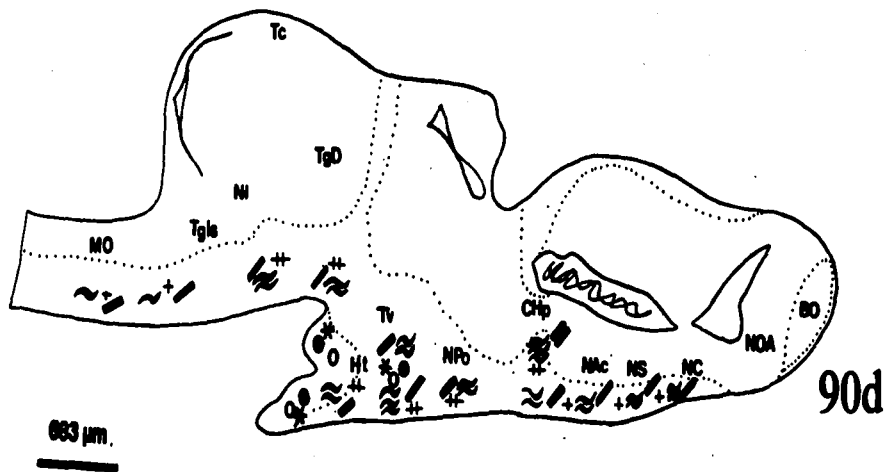


30d



60d

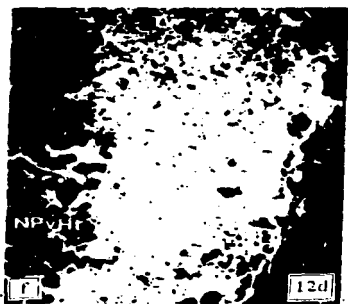
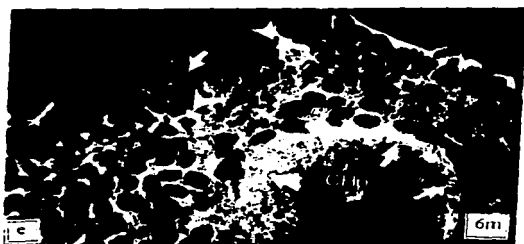
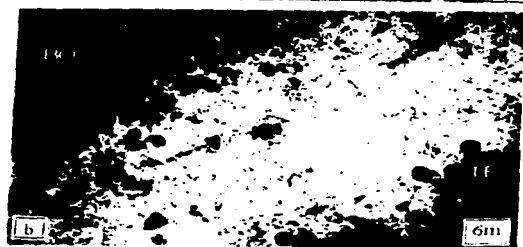
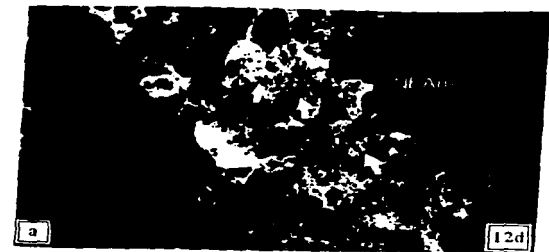
Símbolos: NIR: LE (O), ME (●), OCTA (*). FIR: LE (↔), ME (-), OCTA (∅).



Simbolos: NIR: LE (O), ME (⊙), OCTA (⊛). FIR: LE (+), ME (-), OCTA (/).

Fig. 9. Fotomicrografías del cerebro del axolotl, *A. mexicanum* en diferentes días de desarrollo, donde se muestran las neuronas y las fibras inmunorreactivas (FIR y NIR) a LE. a. FIR a nivel del telencéfalo en el NEAm (↑), día 12. b. FIR (↑) en el NOA a los 6 meses. c. FIR (↑) arrosariadas en el Pv a los 6 meses. d. FIR (↑) en la CHp y en la CA a los 6 meses. e. NIR (∧) y FIR (↑) en la CHp a los 6 meses. f,g,h,i. Cortes a nivel del dicencéfalo en el NPvHt donde se muestran FIR (↑) en los días 12, 16, 22, 49, 53 y 6 meses. j,k. NIR (∧) en el NPvHt. l. FIR (↑) y NIR (∧) en el Ht a los 6 meses. m. FIR (↑) a nivel de la ZM y FR del rombencéfalo en el día 16. n. FIR (↑) en la parte ventral de rombencéfalo de 6 meses. Aumentos: 100X (i, n), 250X (a, b, c, d, e, l, m) y 400X (j,k). Cortes coronales (a,f,g,h,i,j,m) y parasagittales (b,c,d,e,k,l,n).

Abreviaciones: Comisura anterior (CA), comisura hipocámpal (CHp), formación reticular (FR), hipotálamo (Ht), infundíbulo (Ia), núcleo anterior olfatorio (NAO), núcleo estríado amigdalino (NEAm), núcleo fascicular solitario (NFS), núcleo paraventricular hipotálamico (NPvHt), palio ventral (Pv), tálamo ventral (Tv), tercer ventrículo (IIIv), zona motora (ZM).



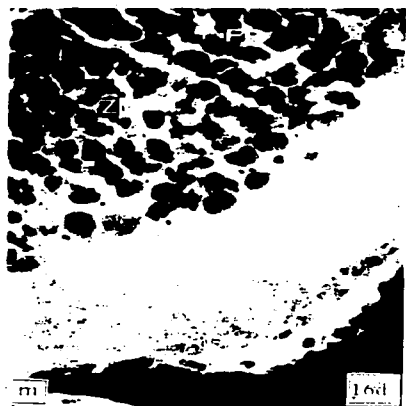
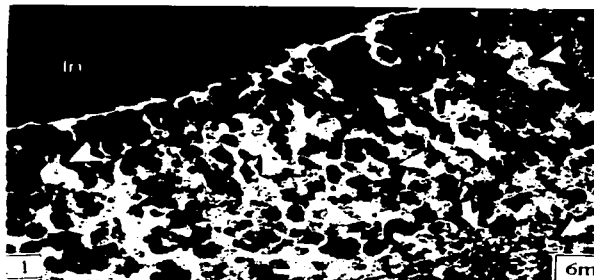
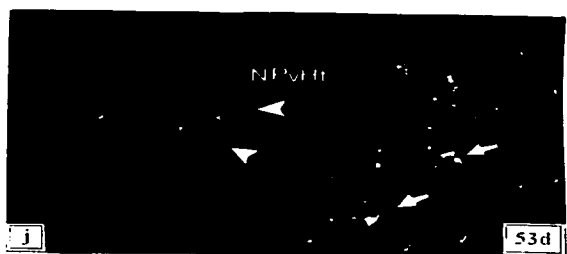
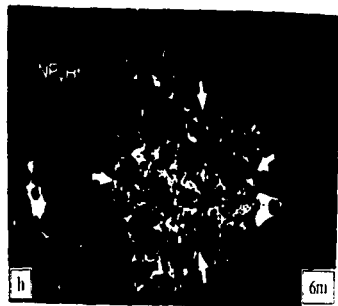
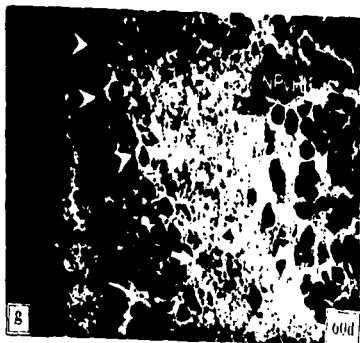
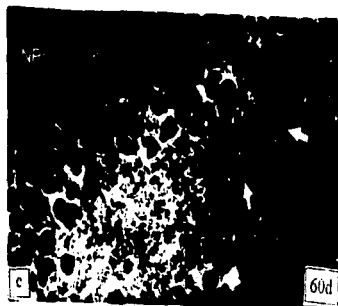
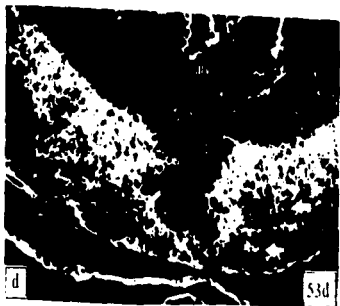
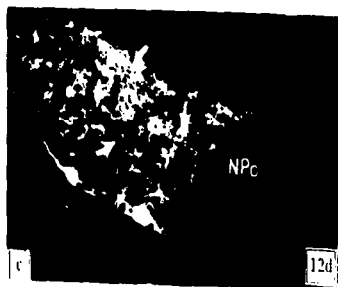
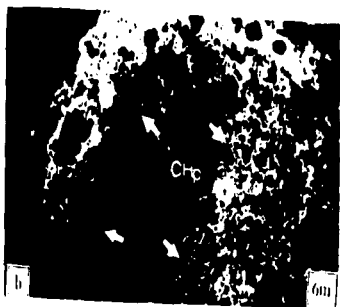


Fig. 10. Fotomicrografías del cerebro del axolotl, *A. mexicanum* en diferentes días de desarrollo, donde se muestran las neuronas y las fibras inmunorreactivas (FIR y NIR) a ME. a. FIR (↑) en la CA en el día 49. b. FIR (↑) en la CHp del mes 6. c,d,e. FIR (↑) en el NPo de los días 12, 53 y 60. f,g,h. FIR (↑) y NIR (∧) en el NPvHt en los días 33 y 60 y a los 6 meses. i,j. FIR (↑) en el Ht en los días 12, 22. k. FIR (↑) y NIR (∧) en el Ht del día 33. l. A mayor aumento las NIR del Ht en el día 33. m, n, ñ. NIR en el Ht en los días 49, 53 y 60. o. FIR (↑) en la ZM del rombencéfalo en el día 22. p. FIR (↑) y NIR (∧) en la parte ventral del rombencéfalo a los 6 meses. q. FIR (↑) en la parte ventral del rombencéfalo a los 6 mes. Cortes coronales (c,d,e,f,g) y parasagitales (a, b, h). Aumentos: 100x (o,g), 250X (a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,p), 400X (l,m,n,ñ).

Abreviaciones: Comisura anterior (CA), comisura hipocámpal (CHp), formación reticular (FR), hipotálamo (HI), infundíbulo (In), núcleo anterior olfatorio (NAO), núcleo estriado amigdalino (NEAm), núcleo preoptico (NPO), núcleo fascicular solitario (NFS), parte ventral del rombencéfalo (PvROM), tegmento istmico (T_{ist}), tercer ventrículo (IIIv), zona motora (ZM).



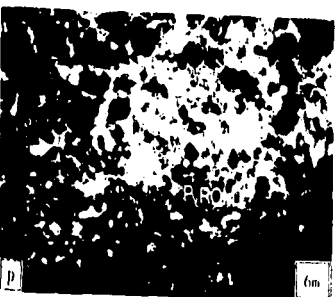
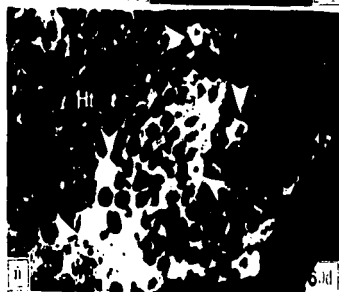
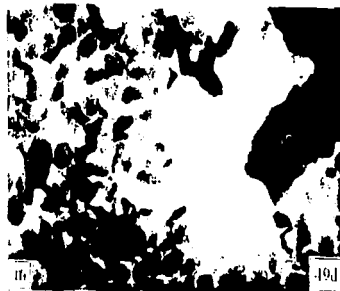
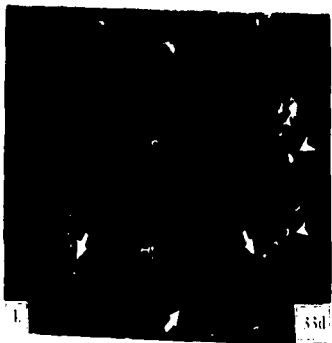
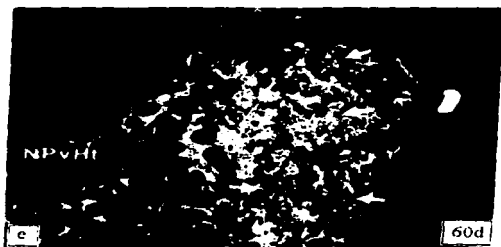
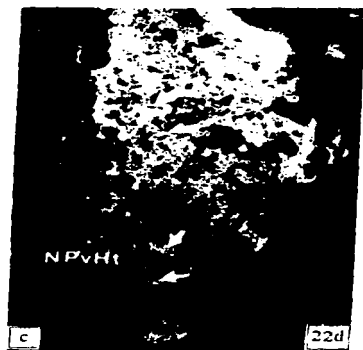
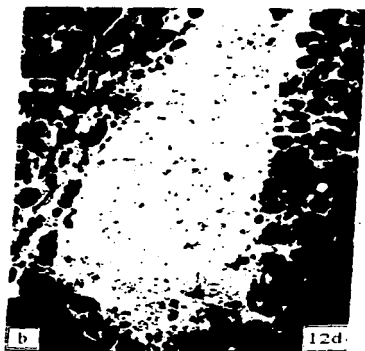


Fig. 11. Fotomicrografías del cerebro del axolotl, *A. mexicanum* en diferentes días de desarrollo, donde se muestran las neuronas y fibras inmunorreactivas (FIR y NIR) a OCTA. a. Corte parasagital con FIR (↑) en la parte ventral del telencéfalo (PvTE) a los 6 mes. b,c,d,e. FIR (↑) en el Tv y el NPvHt de los días 12, 22, 53 y 60. f,g. FIR (↑) en el Ht de los días 12, 22. h. FIR (↑) y NIR (∧) en el Ht del día 53. i. NIR en el Ht, cercanas al infundilo. j. FIR (↑) en la ZM del rombencéfalo del día 60. k,l. Cortes parasagitales del rombencéfalo del mes 6, donde se muestran NIR (∧) y FIR (↑) en el NFS. Coronal (b,c,d,f,g,h,i) y parasagital (a,e,j,k,l). Aumentos: 250X (a,b,c,d,e,f,g,h) y 400X (i,k).

Abreviaturas: Hipotálamo (Ht), infundículo (In), núcleo fascicular solitario (NFS), núcleo paraventricular hipotalámico (NPvHt), núcleo fascicular solitario (NFS), parte ventral del telencéfalo (PvTE), talamo ventral (Tv), zona motora (ZM).



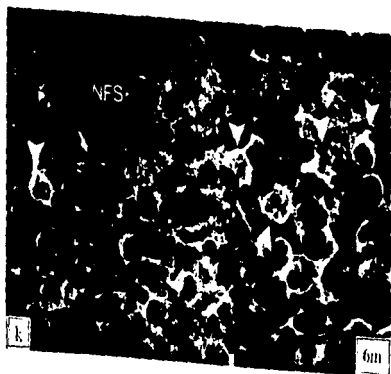
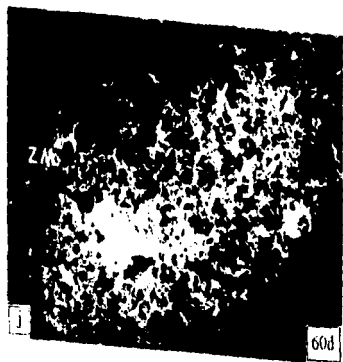


Tabla XII. Distribución de la inmunoreactividad a Leu-encefalina en el desarrollo del SNC del axolotl, *Ambystoma mexicanum*.

Día / Región del SNC	12	14	15	16	20	22	26	28	30	33	36	45	49	53	60	90	180	Adulto	
	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F		
TELENCEFALO																			
Bulbo olfatorio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
Plata dorsal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Plata piriforme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plata hipocámpal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Núcleo septal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Núcleo subpretectal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Cuerpo geniculado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Núcleo amigdalino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Núcleo cuneado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Comisura anterior	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Comisura hipocámpal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Táctus ventral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
DIENCEFALO																			
Núcleo lateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Núcleo preótico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Núcleo talámico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Núcleo paraventricular hipotálamico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Hipófisis	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	●+++	●++	●++	●++	●++	●+++	●+++
MESENCEFALO																			
Tectum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●++
Tegmentum	++	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	++	+++	++	+	++	++	++	●++
Ítem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Cerebelo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ROMBENCEFALO																			
Médula oblonga	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●++
Zona sensorial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●++
Formación reticular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●++
Zona motora	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++

Abreviaciones: neuronas, N; fibras, F; ausencia de N y F inmunoreactivas, -; neuronas inmunoreactivas, ●. Densidad de fibras inmunoreactivas: + escasa, ++ media y +++ alta.

Tabla XIII. Distribución de la inmunoreactividad a Met-enkefalina en el desarrollo del SNC del axolotl, *Ambystoma mexicanum*.

Día / Región del SNC	12	14	15	16	20	22	26	28	30	33	36	43	49	53	60	69	100	Adulto
	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	
TELENCEFALO																		
Bulbo olivario	+++
Placa dorsal	++
Placa ventral	+
Placa hipocámpica	+
Núcleo preoptico	●+++
Núcleo amigdalino	●+++
Corpo calloso	+++
Núcleo subpretectal	+++
Núcleo subpretectal	+++
Comisura anterior	++	++	++	.	++	++	+	++	++	●+++
Comisura hipocámpica	++	++	++	.	++	++	+	++	++	●+++
Tectus ventral	++	+++
DIENCEFALO																		
Núcleo subpretectal	+++
Núcleo preoptico	.	+	++	+	++	+	++	++	++	+	++	+	++	+++	+	++	++	●+++
Núcleo subpretectal	.	+	++	+	++	+	++	++	++	+	++	+	++	+++	+	++	++	●+++
Núcleo paraventricular hipotalámico	.	++	++	+++	++	++	+++	++	++	●++	+++	++	+++	●+++	●+++	●+++	●+++	●+++
Hipofisis	.	++	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	●+++	●+++	●+++	●+++	●+++	●+++	●+++	●+	●+++
MESENCEFALO																		
Tectum	+
Tegumen	.	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	●++
Intero	.	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	●+++
Cerebelo	+
ROMBENCEFALO																		
Núcleo olivario	●+++
Zona ventral	++	++	+	.	●+++
Formación reticular	++	++	+	.	●+++
Zona motor	.	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	●++

Abreviaciones: N; fibras, F; ausencia de N y F inmunoreactivas, -; neuronas inmunoreactivas, ●. Densidad de fibras inmunoreactivas: + escasa, ++ media y +++ alta.

Tabla XIV. Distribución de la inmunorreactividad a Octapéptido en el desarrollo del SNC del axolotl, *Ambystoma mexicanum*.

Día / Región del SNC	12	14	15	16	20	22	26	28	30	33	36	45	49	53	60	90	100	Abdo.
	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	N F	
TELENCEFALO																		
Bulbo olivario	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Pulso dorsal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Pulso piriforme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	●
Pulso hipocámpal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Médula espinal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Médula sacral	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Campo estríado	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Médula antilabial	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Médula caudal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Comisura anterior	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Comisura hipocámpal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Tuérculo ventral	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
DIENCEFALO																		
Médula intermedia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Médula posterior	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Médula anterior	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Médula paraventricular	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Hipotálamo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
Hipofisis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
MESENFALO																		
Tuérculo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Tuérculo anterior	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Intero	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Cerebelo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
ROMBENCEFALO																		
Médula oblonga	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Zona esofágica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Formación reticular	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Zona torácica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++

Abreviaciones: N, neuronas; F, fibras; +, ausencia de N y F inmunorreactivas; -, neuronas inmunorreactivas; ●, densidad de fibras inmunorreactivas: + escasa, ++ media y +++ alta.

RECIBIDO EN LA BIBLIOTECA DE LA UNAM EL 20 DE ABRIL DE 1982

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue determinar la existencia y localización anatómica de los péptidos opioides (LE, ME y OCTA) durante el desarrollo ontogenético del sistema nervioso central del *A. mexicanum*, para lo cual utilizamos la técnica indirecta de inmunofluorescencia. Para realizar este estudio fue necesario la obtención de huevos fértiles del *A. mexicanum*, los cuales se obtuvieron de dos maneras: a) bajo condiciones de laboratorio, en la temporada de reproducción y b) con la utilización de un procedimiento para la ovoposición y fertilización *in vitro*, que se discutirá a continuación. Posteriormente, se analizarán los resultados inmunohistoquímicos.

Estimulación de la Ovoposición y Fertilización *in vitro*

Como se mencionó en los antecedentes, la reproducción del *A. mexicanum* es durante el invierno y la primavera. Para la obtención de huevos fértiles fuera de esta temporada es necesario la estimulación hormonal. Existen en la literatura varias técnicas para realizar este proceso (Trottier y Armstrong, 1974; Armstrong y Gillespie, 1981; Slack, 1984), donde se utilizan diferentes hormonas, tales como la FSH, LH y GCH para la estimulación de la ovoposición o del espermátforo. Nosotros nos basamos en los procedimientos de Armstrong y Gillespie (1981) y el de Slack (1984) (ver anexo I). Las dosis utilizadas para la inducción de la ovoposición del *A. mexicanum* fueron tomadas de estos protocolos (tabla V). Se realizaron nueve experimentos, donde se probaron las hormonas: LH (Sigma), FSH (Sigma), σ FSH-18 (NHPP), bLH-6 (NHPP) y GCH (Sigma). Tres experimentos con las hormonas FSH+LH y ocho con la GCH. Los resultados de la estimulación con las hormonas FSH y LH, tanto de la marca Sigma como las donadas por la asociación NHPP (σ FSH-18 y bLH-6), a dosis de 80-400 UI y 5.3 UI respectivamente no tuvieron efecto, ni en la hembra ni en el macho. Armstrong y Gillespie (1981)

utilizaron FSH (80 UI) y FSH (50 µg), y obtuvieron ovoposiciones con un 70% de huevos fértiles y liberación del espermatozoido. Además, sugieren estimular previamente al macho con GCH o ponerlo 30 min en agua fría (10 °C). Se probaron éstas condiciones, sin obtener respuesta. Con respecto a las hormonas donadas, éstas no se habían probado en anfibios, aunque en ratas son efectivas para estimular la ovulación. En nuestros experimentos no se produjo la estimulación. Dado que no se cuenta con la secuencia constitutiva de la FSH y de la LH de anfibios, estos resultados pueden explicarse debido a que posiblemente la secuencia de las hormonas de mamífero sea diferente a la de los anfibios. Otra posibilidad puede ser las dosis utilizadas.

En el trabajo de Armstrong y Gillespie (1981), estimulan tanto a los machos como a las hembras con la hormona GCH. A dosis de 250 UI obtienen un total de 501 puestas con un 89% de huevos fértiles y a dosis de 500 UI un total de 70 puestas con un 91.4% de huevos fértiles. En nuestros experimentos, cuando la estimulación hormonal se llevó a cabo cerca o dentro del periodo de reproducción natural (octubre-noviembre) se pueden estimular con una dosis de GCH de 250 UI (experimentos 1-4 de la tabla IX). De lo contrario la dosis es de 600 UI (experimentos 5-8, 10, 12 de las tablas IX y X). Esto se debe a que cerca de la época de reproducción sus niveles hormonales son más altos y se requiere una dosis menor de la hormona para producir el efecto (Polzonetti-Magni et al., 1995). La mayoría de los experimentos se realizaron fuera de la temporada de reproducción y la dosis que se empleo más fue la de 600 UI. Armstrong y Gillespie no mencionan si las diferentes dosis que ellos emplean dependen de este factor, sin embargo, el mayor número de puestas que obtienen es con la dosis de 250 UI. En nuestros experimentos el 50% de las hembras tratadas respondieron a la estimulación con GCH. Nosotros empleamos en ocho experimentos la hormona GCH a una dosis de 250 y 600 UI. Se obtuvieron puestas de entre 300 y 1000 huevos infértiles (tablas IX, X), ya que el macho nunca liberó el espermatozoido. Este mismo hecho no solo se ha observado en salamandras (Slack, 1984), sino también en ranas (Kao y Elison, 1988; Saint-Jeannet y Dawin, 1994) donde se ha optado por sacrificar al macho para extraer los conductos deferentes y fertilizar los huevos con una solución espermática. En el

método modificado de Slack (1984) (ver anexo II), además de emplear las hormonas FSH y GCH, también sacrifican al macho. Este método con algunas modificaciones, tales como: no macerar los conductos deferentes, sino conservarlos íntegros e irlos cortando conforme se haga la fertilización, colectar los huevos antes de que se hidraten (20 min.), etc.; fueron importantes para obtener mejores resultados. De esta serie de experimentos se obtuvo el método para la obtención de huevos fértiles en nuestro laboratorio (ver método de fertilización *in vitro* en la sección de resultados). Este se utilizó en dos experimentos con un total de 40 huevos fértiles por puesta (tabla X, experimentos 10 y 12). En el trabajo de Armstrong y Gillespie (1981) obtienen alrededor de 600 huevos fértiles por puesta, mientras que el estudio de Slack (1984) no se reporta el número de huevos fertilizados, únicamente se limita al procedimiento de obtención de huevos. No se realizaron más experimentos, ya que inició la época de reproducción natural y se obtuvieron los huevos suficientes para el estudio.

Es interesante hacer notar que para la obtención de huevos fértiles de manera artificial se deben considerar los siguientes factores: las condiciones del ajolotario, el periodo de luz-obscuridad, la alimentación y el estado de salud de los axolotls, etc. En el caso de la fertilización *in vitro*, según la época del año en que se planea la fertilización para elegir la dosis adecuada de la hormona. En el momento de las ovoposiciones considerar el tiempo que transcurre desde la puesta hasta la fertilización, la viabilidad y densidad de la solución de los espermatozoides y la temperatura a la que se van a desarrollar los huevos.

Estudio Histológico

El estudio histológico se realizó con el fin de obtener una base morfológica para la localización de las diferentes estructuras neuroanatómicas durante el desarrollo del SNC del *A. mexicanum*. Ya que no se contaba con estudios detallados al respecto. Se tomó como base el atlas del *A. tigrinum* de Herrick, J. (1917) y otros trabajos de desarrollo ontogenético de dos

especies de salamandras: *Pleurodeles waltlii* y *Triturus alpestris* (González y col., 1995; Naujoks-Manteuffel y col., 1994). El desarrollo neuroanatómico del *A. mexicanum* se pudo comparar con estas especies de anuros, ya que no presenta grandes diferencias en los tiempos de desarrollo y la morfología de las estructuras cerebrales (González y col., 1995; Naujo-Manteural y col., 1994). También se emplearon las tablas de desarrollo del *A. mexicanum* (Schreckenbergy y Jacobson, 1975) y las del *A. punctatum* (Harrison, 1969) para los cambios morfológicos externos y determinación del estadio de las larvas. Además los resultados de este estudio serán de gran utilidad para subsecuentes estudios ontogénicos del SNC del *A. mexicanum*.

Estudio Inmunohistoquímico

El inicio de la inmunorreactividad fue el día 12 del desarrollo del SNC del *A. mexicanum* para los tres péptidos utilizados (LE, ME y OCTA). Las fibras fueron las primeras estructuras en presentar inmunorreactividad. Palmer y col. (1982) reportan la presencia de FIR a encefalinas en la parte ventral del rombencéfalo a los 15 días del desarrollo embrionario del cerebro de la rata. Por otro lado, nuestros datos coinciden con los diferentes estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos realizados en aves y mamíferos donde se ve que la mayoría de los neuropéptidos, incluyendo las encefalinas, comienzan a detectarse en etapas tempranas (día embrionario 13) del desarrollo (Boer y Swaab, 1985).

La localización de FIR a los 12 días del desarrollo fue principalmente en el núcleo paraventricular hipotalámico e hipotálamo en el diencéfalo, y de algunas estructuras del mesencéfalo (tegmentum e istmo). En el telencéfalo no se observó ninguna estructura inmunorreactiva, probablemente porque aún no está bien formado. El rombencéfalo presentó una densidad escasa de FIR a LE y ME en la zona motora. Desde el momento en que se detectaron los tres péptidos hasta la etapa de seis meses, presentaron una distribución anatómica similar (tablas XII, XIII y XIV). Este patrón se observa en la etapa de adulto del *A. mexicanum*

(Sánchez-Islas, 1993), reptiles (Reiner, 1987), aves (Reiner et al., 1984) y mamíferos (Khachaturian et al., 1985), donde la inmunorreactividad a LE y a ME tiene una distribución paralela en el SNC, presentándose en los mismos núcleos cerebrales. Este hecho se ha descrito 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 (Eldre et al., 1976; Petrusz et al., 1985). Sin embargo, no se ha demostrado coexistencia de LE y ME en la misma neurona, lo que nos habla de procesamientos proteolíticos diferentes. Con nuestros experimentos seriados no se puede afirmar la coexistencia de los 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, como la rana *Xenopus laevis* (Martens y Herbert, 1984; Wong et al., 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 et al., 1987) como sucede en el núcleo negro de la rata (Zamir et al., 1984). Esto mismo puede suceder en el axolotl. Además, el gen de la proencefalina del *Xenopus* carece de la secuencia del octapéptido. Sin embargo, nosotros en el *A. mexicanum* encontramos inmunorreactividad a este péptido, lo cual podría indicar que se trata de una variante con una secuencia similar al OCTA .

Asai y col. (1988) demostraron mediante radioinmunoanálisis en el cerebro del adulto *A. mexicanum* que la concentración de ME es mayor con respecto a LE. En nuestro estudio desde el momento en que se detectaron estructuras inmunorreactivas, se presentó una densidad mayor de FIR a ME en comparación a la de LE y OCTA. Este hecho no sólo se ha visto en anfibios sino también en reptiles (Reiner, 1987), aves (Reiner et al., 1984; Bayón et al., 1980) y mamíferos (Noda et al., 1982; Comb et al., 1982).

En el inicio de la inmunorreactividad (día 12) se encontraron estructuras inmunorreactivas a los tres anticuerpos probados, sin embargo, se sabe que la ME corresponde a la categoría de los neuropéptidos que se presentan en los primeros períodos prenatales (día 13-14 embrionario), incrementándose rápidamente con la edad, hasta alcanzar un máximo contenido en la edad postnatal y continua para exhibir altos niveles de expresión en la etapa adulta (Tohyama, 1992). Otra característica que se presentó fue la variación en la densidad de FIR en las estructuras cerebrales durante los diferentes días del desarrollo, especialmente en el telencéfalo y el mesencéfalo (tablas XII, XIII y XIV). Un patrón similar se ha visto en otros neuropéptidos, incluyendo las encefalinas (Bayón et al., 1979; Boer y Swaab, 1985; Zagon et al., 1994; Mitchell et al., 1995). Al respecto pueden existir varias posibilidades que expliquen esta observación, una de ellas es donde los péptidos opioides (encefalinas, endorfinas y dinorfinas), de diferentes organismos, participan en procesos biológicos, sujetos a ritmos celulares (circadianos y circanuales), lo que hace que haya cambios selectivos en la concentración tisular de estos péptidos relacionados con los diferentes procesos fisiológicos (Bubenik et al., 1988; Gutiérrez et al., 1991; Matamoros et al., 1997). Sin embargo, durante el desarrollo aún no se puede hablar de un ritmo, ya que el organismo se encuentra con diferentes cambios neuromorfológicos que no permite que se establezca un ritmo circadiano de expresión del péptido. La producción de péptidos opioides (principalmente la met-encefalina), en etapas tempranas, se ha visto más relacionada con zonas de proliferación y diferenciación neuronal, donde se sugiere que las encefalinas están interviniendo como factores de crecimiento (Zagon y McLaughlin, 1991; Zagon et al., 1996). Otra posibilidad es la que se tiene con el estudio realizado por Zagon y col. (1994) donde utilizaron "Northern blot" para ver en el desarrollo del cerebro y cerebelo de la rata la expresión del ARNm del gen de la preproencefalina A (PPE), precursor de la Met-encefalina. Encontraron que durante este proceso, se pueden encontrar diferentes modelos de expresión (incremento, decremento y cambios no perceptibles) del ARNm de la PPE y puede ser detectados en relación al período fetal/neonatal de la rata. Lo que demuestra que no solamente hay variaciones de expresión a nivel

del producto final, o sea el péptido activo, contenido en neuronas y fibras; sino también a nivel del precursor relacionadas con los días del desarrollo.

La densidad de FIR a los tres péptidos se incremento con respecto a la edad de las larvas. El aumento se hizo mas notable apartir del día 30 para ME, mientras que para LE se vio en el día 40. Las FIR a OCTA también se incrementaron ligeramente apartir del día 30 (tablas XII, XIII y XIV). Apartir del día 30, se observaron grupos pequeños de NIR (1-3 neuronas) con una fluorescencia baja, localizados principalmente en el núcleo paraventricular hipotalámico e hipotálamo del diencefalo. En las otras regiones cerebrales (por ej. cuerpo estriado, comisura anterior e hipocampal y la zona sensorial y motora del rombencéfalo) se vieron NIR a los tres péptidos hasta los seis meses de edad. Al igual que la densidad de las FIR, el número de NIR y intensidad de la fluorescencia se fue incrementando con respecto a los días de desarrollo. Los grupos grandes de NIR (de 10 a 15 neuronas) se observaron nuevamente en el diencefalo (núcleo paraventricular hipotalámico e hipotálamo). Estudios inmunohistoquímicos y de radioinmunoanálisis han mostrado que esta zona, en el axolotl adulto, se concentra la mayor cantidad de encefalinas (Asai et al., 1988; Sánchez-Islas, 1994). Un hecho similar se presenta en otros vertebrados (Bayón et al., 1980; Comb et al., 1982; Noda et al., 1982; Reiner et al., 1982; Reiner, 1987). Mientras que en el telencéfalo y mesencéfalo no se observaron NIR. Este dato difiere con lo reportado en aves (Reiner et al., 1984; Du y Dubois, 1988; Casini et al., 1995; Garner et al., 1994) y mamíferos (Palmer et al., 1982; Senba et al., 1982; Mitchell et al., 1995) donde en el telencéfalo se han visto NIR desde etapas tempranas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente en el trabajo Palmer y col. (1982) primero se observaron fibras inmunorreactivas en el rombencéfalo en el día embrionario 15 y hasta el día embrionario 17 se presentaron neuronas inmunorreactivas. Una posibilidad que podría explicar el patrón de distribución que obtuvimos es la sensibilidad de la técnica empleada, ya que se ha visto que la biosíntesis de las encefalinas en etapas tempranas se producen en bajos niveles (Bayón et al., 1979) o en otros casos las encefalinas pueden estar en forma del precursor (Pittius et al., 1987,

Laurent-Huck et al., 1991) y no es fácil detectarlo por medio de inmunohistoquímica. Por lo que existen otras técnicas más sensibles como el complejo biotina-avidina peroxidasa, el radioinmunoanálisis y la hibridización *in situ* (McGregor et al., 1982; Palmer et al., 1982; Mitchell et al., 1995), con las que se pueden identificar los grupos de NIR desde etapas más tempranas del desarrollo. Además, en estos estudios a los animales (ratas, ratones) empleados se les aplica, previo a su sacrificio, una dosis intraventricular de colchicina; la cual detiene el transporte axonal y concentra más el péptido en el soma neuronal. En nuestro experimento no se realizó este procedimiento porque se detendría el desarrollo de las larvas. Sin embargo, el patrón de distribución y la forma que fueron incrementando las NIR y FIR durante el desarrollo en nuestro estudio, se asemeja al descrito en mamíferos y aves, en los que se ha visto un aumento en la densidad de fibras y terminales nerviosas inmunorreactivas, el cual va paralelo al incremento y decremento de neuronas marcadas en la etapa prenatal y postnatal, respectivamente. Mitchell y col. (1995) sugieren que durante el desarrollo hay un aumento progresivo en la velocidad de transporte del péptido dentro de los axones hacia la terminal, que resulta ser más eficiente en la etapa adulta que en los primeros días de desarrollo. Este hecho podría ser la causa de que en los mamíferos, en la etapa prenatal, se encuentran más somas neuronales marcadas que en la postnatal. En el axolotl este patrón de incremento de neuronas y fibras se da hasta la etapa adulta y no se observa disminución de neuronas inmunorreactivas, a diferencia de los mamíferos y de las aves, en los cuales se ha visto que hay un cambio en estadios determinados (eclosión o nacimiento) que influyen en los niveles de varios péptidos (Bayón et al., 1979; Reiner et al., 1984; Boer y Swaab, 1985; Du y Dubois, 1988). En el axolotl, antes y después de la eclosión (día 13-15), en las muestras procesadas de los días 12 y 16, correspondientes a este periodo, no se observaron cambios en la densidad de fibras ni de neuronas inmunorreactivas, por lo que se puede sugerir que no hay alguna relación estrecha de la eclosión con la biosíntesis de encefalinas. Sin embargo, al inducir la metamorfosis con tiroxina (T4) al *A. mexicanum*, se observa un cambio en nivel de encefalinas, principalmente LE, del lóbulo anterior de la hipófisis de la salamandra (estado adulto del *Ambystoma*) (León Olea et al., 1995). Un hecho similar se observó en el *A.*

tigrinum, el cual presenta de manera natural metamorfosis (Cano-Martínez, 1995). Estos resultados muestran que estos péptidos presentan cambios en su distribución anatómica durante el desarrollo ontogenético.

La comparación de la distribución de la inmunorreactividad a los tres péptidos opioides de la larva de seis meses con respecto a la del adulto neoténico mostró diferencias en el número de neuronas y la densidad de fibras inmonorreactivas; por ejemplo, en la larva de seis meses no hay NIR en el telencéfalo (núcleos hipocampal y septal) y en el mesencéfalo (tectum y tegmentum); la densidad de FIR, principalmente en el telencéfalo no se asemeja a la observada en el adulto (tablas XII, XIII, XIV).

La presencia temprana de las encefalinas en las estructuras cerebrales del *A. mexicanum* puede sugerir que están participando en diferentes fenómenos relacionados con el crecimiento, diferenciación y desarrollo del cerebro de este anfibio, funciones que en el adulto cambian, tal y como sucede en los mamíferos (Laurent-Huck et al., 1991; Zagon y McLaughlin, 1991; Zagon y McLaughlin, 1994; Zagon et al., 1996).

Conclusiones

Fertilización *in vitro*

-La hormona FSH a dosis de 80 y 400 UI y la LH a dosis de 5.3 UI, no produjeron respuesta en la estimulación de la ovoposición en el *A. mexicanum*.

-La hormona GCH, a dosis de 250 y 600 UI, estimulan la ovoposición en el axolotl.

-La dosis de la hormona GCH, para estimular la ovoposición en el axolotl, dependió de la época del año, ya que fuera de la temporada de reproducción la dosis fue mayor (600 UI) y dentro o cerca de este periodo, la dosis fue menor (250 UI).

-A partir del método desarrollado en el laboratorio, se logró la fertilización *in vitro*. Sin embargo, la mayor fuente de obtención de huevos fértiles fue durante la época de reproducción (invierno y primavera) en las condiciones del laboratorio.

-El éxito de la reproducción de los ajolotes depende de su estado de salud y de las condiciones del ajolotario.

Estudio inmunohistoquímico

-En el SNC del *A. mexicanum*, la inmunorreactividad a péptidos opioides se detectó desde el día 12 del desarrollo y se localizó principalmente en fibras de la parte ventral del cerebro, núcleo estriomagdalino, núcleos hipotalámicos.

-Nuestros resultados concuerdan con otros trabajos en cuanto a que los péptidos opioides se encuentran en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, el papel que juegan en éste proceso tendrá que ser determinado.

-La densidad de fibras y el número de neuronas inmunorreactivas fueron en aumento conforme la edad de las larvas.

-Las neuronas inmunorreactivas a los tres péptidos opioides se localizaron aisladamente a partir del día 30. Posteriormente, se presentaron en pequeños grupos de 2 a 3 neuronas y a los 180 días en grupos de 5 a 15 por región y por corte. La localización de los grupos de neuronas inmunorreactivas fue principalmente en el diencéfalo.

-Los péptidos LE, ME y OCTA se distribuyeron en las mismas regiones anatómicas, pero con diferente densidad. Siendo más abundante la ME.

-Se encontraron diferencias en la distribución de la inmunorreactividad a los tres péptidos estudiados al comparar la larva de 180 días con el adulto neoténico. Por ejemplo, en la larva de 180 días no se encontraron neuronas inmunorreactivas en el palio hipocampal, núcleos septales, comisuras anterior e hipocampal, mesencéfalo y zona sensorial del rombencéfalo.

-La aparición temprana de los péptidos opioides en el desarrollo ontogenético del sistema nervioso central del *Ambystoma mexicanum*, sugiere la participación de estas sustancias endógenas en diferentes mecanismos, tales como proliferación y diferenciación celular, relacionados con el crecimiento y desarrollo de éste sistema.

Este trabajo será la base para experimentos futuros en donde se estudie el posible papel que tienen los péptidos opioides durante el desarrollo del SNC del *A. mexicanum*.

Anexo I.

Métodos de Fertilización *in vitro*.

Método de Armstrong y Gillespie, (1976)

◆ Inducción de la ovulación en la hembra con la aplicación de la hormona foliculo estimulante (FSE), con una dosis de 20 mg más 20 µg de la hormona luteinizante (LH) o 500 UI de GCH vía i.m., inyectadas de 8 a 12 hrs antes de ser colocada con el macho.

◆ El macho libera el espermatozoides, que recoge la hembra por medio de la cloaca y a las 24 hrs. comienza la puesta de huevos fecundados

◆ El espermatozoides puede ser colectado y puesto en un pequeño tubo, en frío, en cerca de 250 µl de 50% de medio de cultivo de Leibovitz L-15 (GIBCO), o en un medio de cultivo para anfibio de Quimby. El espermatozoides es almacenado de esta manera y es viable por 24 h.

◆ Antes de usar el espermatozoides se rompe por trituración con una pipeta Pasteur.

◆ cuando empieza la puesta de huevos se colectan y se secan para quitar el exceso de agua. Los huevos son puestos en una caja petri y se inseminan con unas gotas de la suspensión de espermatozoides.

◆ Después de 10 min., los huevos son puestos en una solución de Holfreter al 25%.

Método de Slack (1984)

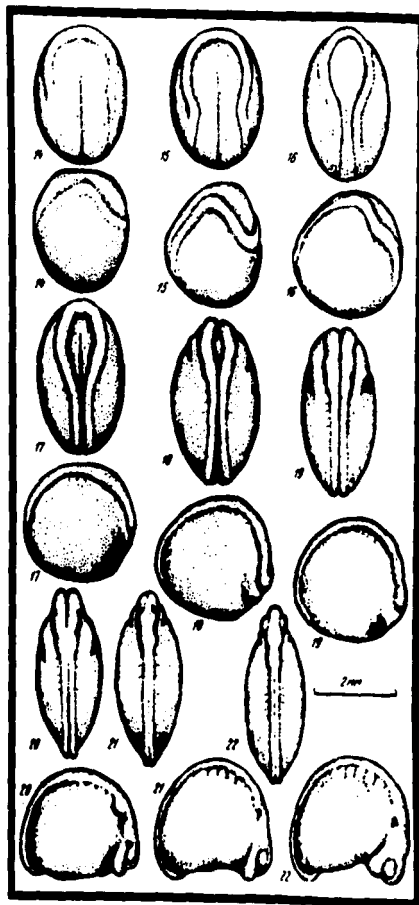
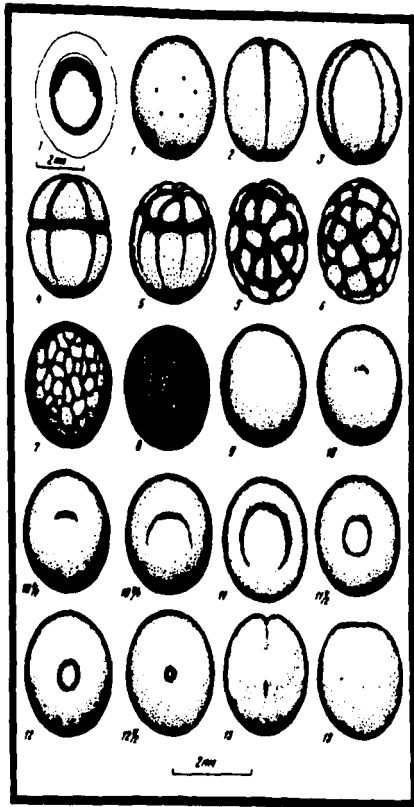
◆ **Inyectar a la hembra con 35 unidades Amour de FSH porcina disueltas en agua estéril i.m. (20 hrs después comienza la puesta de huevos).**

◆ **Se sacrifica al macho y se realiza una disección para extraer los conductos deferentes. Se maceran y se hace una suspensión en el medio de cultivo de Steinberg al 10% (NaCl (3.4 g), KCl (0.05g), CaCl₂ (0.05g), MgSO₄ · 7 H₂O (0.205g), y buffer HEPES (1.10 g/1 l de agua destilada) a un pH de 7.4). La suspensión se mantiene en refrigeración (10 °C).**

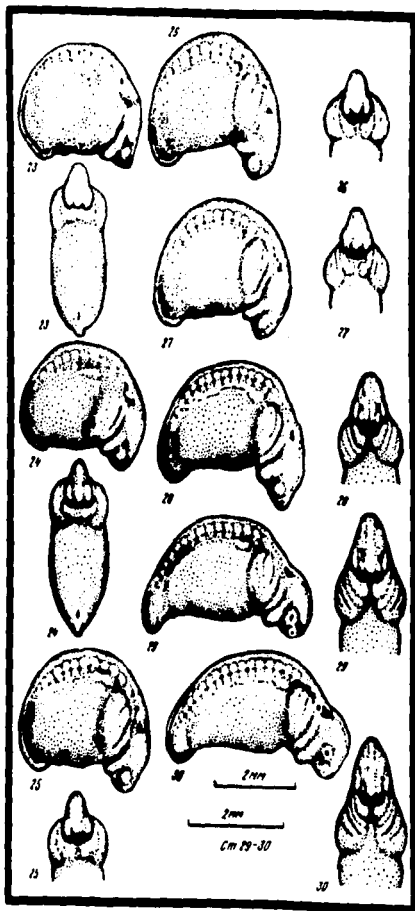
◆ **Se colectan los huevos cada 20 min., se les quita el exceso de agua y se fertilizan con unas gotas de la suspensión de espermatozoides (antes de agregar la suspensión se debe de verificar el movimiento y la densidad de los espermatozoides, la cual debe de ser de 10 a 20 espermatozoides en un campo de 200X). Se dejan 30 min.**

◆ **Posteriormente se colocan los huevos en una solución de Steinberg al 20%. El éxito de la fertilización se comprueba cuando el huevo presenta un orificio en la superficie y por la inversión de la posición del huevo.**

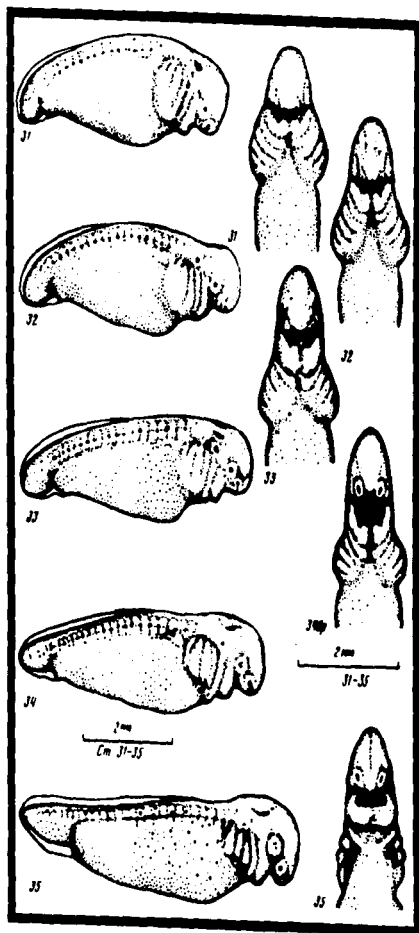
Anexo II



Tablas de desarrollo del *Ambystoma mexicanum* Tomado de Bordzilovskaya NP, Dettiuff TA, Duhon ST. and Malencinski GM: Developmental-Stage series of axolotl embryos. En *Developmental biology of the axolotl*. Cap. 19 (Armstrong JB y Malencinski GM Eds.). Oxford University Press, USA, 201-219.1989



III



IV

BIBLIOGRAFIA

- Akil H, Mayer D, Liebeskind J: Antagonism of stimulation produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*, 191:961-962, 1976.
- Aperia A, Herin P, Eklöv A C, Johnsson V: Importance of AVP for blood pressure control development: a study in the Brattleboro rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 394:350-360, 1982.
- Armstrong B J, Gillespie L L: Induced spawnings and artificial insemination in the axolotl. *Axolotl Newsletter*, 1: 1-3, 1976.
- 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.
- Asai M, Martínez A, Fernández-Mas R, Fernández-Guardiola A: Penicillin-G induced interictal activity increases both opioid peptide tissue content and in vitro release in the rat brain. *Neuropeptide*, 29:163-170, 1995.
- Bayón A, Shoemaker W J, Bloom F E, Mauss A, Guillemin R: Perinatal development of the endorphin- and enkephalin-containing system in the rat brain. *Brain Res.*, 179: 93-101,1979b.
- Bayón A, Koda L, Battenberg E, Azar R, Bloom F: Regional distribution of endorphin, met-enkephalin and leu-enkephalin in the pigeon brain. *Neurosci. Lett.*, 16: 75-80, 1980a.
- Boer G J and Swaab D F: Neuropeptide effects on brain development to be expected from behavioral teratology. *Peptides*, 6: Suppl. 2:21-28, 1985.
- Boer G J, Buijs R M, Swaab D F and De Vries G J: Vasopressin and the developing rat brain. *Peptides*, 1:Suppl. 1:203-209, 1980.
- Brauth S: Enkephalin-like immunoreactivity within the telencephalon of the reptile *Caiman crocodilus*. *Neuroscience*, 11 (2): 345-358, 1984.
- Buijs R M, Velis D N and Swaab D F: Ontogeny of vasopressin and oxytocin in the fetal rat: Early vasopressinergic innervation of the fetal brain. *Peptides*, 1:315-324, 1980.
- Bubenik G A, Smith J H, Flynn: Plasma levels of β -endorphin in white-tailed deer: seasonal variation and the effect of thyroxine, GNRH, dexamethasone and ACTH administration. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90 (A):309-313, 1988.
- Cano-Martínez A: Péptidos opioides en los anfibios. *Salud mental*, 18: 23-38, 1995.
- Casini G, Molnar M, Davis B M, Bagnoli P: Posthatching development of preproenkephalin mRNA-expressing cell population in the pigeon the pigeon telencephalon. *Dev. Brain Res.*, 84: 233-244, 1995.
- Chang K J, Cooper B R, Hazum E, Cuatrecasas P: Multiple opiate receptor: Different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. *Mol. Pharmacol.*, 16: 91-104, 1979.

- Comb M, Soeburg P H, Adelman J, Eiden L, Hebert E: Primary structure of the human met- and leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*, 295:663-664, 1982.
- Cone C y Goldstein A: A dynorphin-like opioid in the central nervous system of an amphibian. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3345-3349, 1983.
- Coons A H: Fluorescent antibody methods. In *general cytochemical methods* (Danielh JF, Eds.). Pp. 349-422. Academic Press, NY, USA, 1958.
- Conklin P M, Schindler W J, Hull S F: Hypothalamic thyrotropin releasing factor. Activity and pituitary responsiveness during development of the rat. *Neuroendocrinology*, 11:197-211, 1973.
- Doerr-Schoott J, Dubois M P, Linchte L C: Immunohistochemical localization of substance reactive to antisera against α - and β -endorphin in the brain of *Rana temporaria* L. *Cell. Tissue Res.*, 217:79-92, 1981.
- 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, 1984.
- Du F and Dubois P M: Development and distribution of enkephalin-immunoreactive elements in the chicken spinal cord. *Neuroscience*, 27:251-266, 1988.
- Elde R, Hökfelt T, Johansson O, Terenius L: Immunohistochemical studies using antibodies to leucine-enkephalin: Initial observations on the nervous system of the rat. *Neuroscience*, 5:349-541, 1976.
- Elkabes S, Loh P Y, Nieburgs A, Wrag S: Prenatal ontogenesis of pro-opiomelanocortin in the mouse central nervous system and pituitary gland: an *in situ* hybridization and immunocytochemical study. *Dev. Brain Res.* 46: 85-95, 1989.
- Foster G A and Schultzberg M: Immunohistochemical analysis of the ontogeny of neuropeptide Y immunoreactive neurons of fetal rat brain. *Int. J. Dev. Neuroscience*, 2:387-407, 1984.
- Garner L K, Mendelson B, Albers K M, Kindy M, Overbeck T L, Davis B M: Ontogeny and effect of activity on proenkephalin mRNA expression during development of the chick spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 347:36-46, 1994.
- Goldstein A, Fischli W, Lowney L L, Hunkapiller M, Hood L: Porcine pituitary dynorphin: Complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 78:7219-7223, 1971.
- González A, Marín O, Smeets W J A J: Development of catecholamine systems in the central nervous system of the newt *Pleurodeles walitli* as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* 360: 33-48, 1995.
- Gubler U, Soeburg P, Hoffman B J, Gage L P, Udenfriend S: Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature*, 295:206-208, 1982.
- 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.

- Gutierrez R, Asai M: IR-met and IR-leu enkephalin content in the periesophageal ganglia of *Helix aspersa*. Seasonal variations. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100(C):609-613, 1991.
- Harrison G R: Harrison stages and description of the normal development of the spotted salamander, *Ambystoma* (Linn). En Harrison G R. Organization and development of the embryo. Ed S. Wilens. Yale University Press, New Haven. CT. USA. pp 44-66, 1969.
- Herrick C J: The brain of the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*, University of Chicago Press, Chicago; USA. 1948.
- Hughes J: Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.*, 88: 295-308, 1975.
- 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.
- Josefsson J O, Johansson P: Naloxone-reversible effects of opioids on pinocytosis in *Amoeba proteus*. *Nature*, 282:78-80, 1979.
- Kakidani Seeburg P H, Adelman J, Eiden L, Hebert E: Primary structure of the human met- and leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*, 295: 663-664, 1982.
- 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.
- Kao R K and Elison P R: The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in the dorsoanterior enhanced *Xenopus laevis* embryos. *Develop. Biol.* 127:64-77, 1988.
- Kavaliers M, Hirst M, Teskey G C: Opioid systems and feeding in the slug, *Limax maximus*. *Brain Res. Bull.*, 14: 681-685, 1985.
- Kavaliers M, Hirst M: Naloxone-reversible stress-induced feeding and analgesia in the slug *Limax maximus*. *Life Sci.*, 38: 203-209, 1989.
- Keshet E, Polakiewicz D, Itin A, Ornog A, Rosen H: Proenkephalin A is expressed in mesodermal lineages cloning organogenesis. *Emb. J.* 8(10):2917-2923, 1989.
- Khachaturian H, Lewis E, Schafer K H, Watson S: Anatomy of the CNS opioid systems. *Trends Nerv. Sys.*, 8: 111-118, 1985.
- Kilpatrick D, Howells R, Lahm H M, Udenfriend S: Evidence for a proenkephalin-like precursor in amphibian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 :5772-5775, 1983.
- Laurent-Huck F M, Stoeckel M E, Felix J M: Ontogeny of proenkephalin gene expression in the rat hypothalamus. *Dev. Brain Res.* 62:33-43, 1991.
- León-Olea M, Sánchez-Alvarez M, Briones M, Martínez-Servín M: Existencia de inmunoreactividad a Leu-enkefalina en neuronas de caracol de jardín (*Helix aspersa*). *Memorias del XXX Congreso Nal. de Ciencias Fisiol.*, Jalapa, Ver., 1987.

- León-Olea M, Sánchez-Alvarez M, Piña A, Bayón A: Evidence for enkephalin-and endorphin-immunoreactivity cells in the anterior pituitary of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J. Comp. Neurol.*, 305: 412-420, 1991.
- León-Olea M, Sánchez-Islas E, Pellicer F, Sánchez-Alvarez M, Rocha L: Ontogenic changes in the anatomical distribution of leu-enkephalin in the adenohypophysis of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Soc. Neurosc. Washington, D.C.*, 1993.
- León-Olea M, Sánchez-Alvarez M, Sánchez-Islas E, Clapp C, Pellicer F: Changes in the anatomical distribution of opioid peptides, prolactin and ACTH in hypophysis of axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Soc. Neurosc. Washington, D.C.*, 1996.
- Leroith D, Liotta A, Roch J, Scilach J, Lewis M, Pert C, Kreiger D: Corticotrophin and endorphine like materials are native to unicellular organism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 2086-2090, 1982.
- 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.
- Luna L G: Manual of histologic staining methods of the armed forces Institute of Pathology. 3er. edición, Mc Graw Hill, U.S.A., 1968.
- Martens G, Herbert E: Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. *Nature*, 310:251-254, 1984.
- Martens C, Givelli O, Herbert H E: Nucleotide sequence of cloned cDNA for proopiomelanocortin in the amphibian *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.*, 260: 13685-13689, 1985.
- Matamoros-Trejo G, Asai C M: Variación estacional de péptidos opioides en el cerebro de la rata albina. *Salud Mental*, 19:36-42, 1996.
- McGregor G P, Woodmans P L, O'Shaughnessy D J, Ghatei A M, Polak M J and Bloom S R: Developmental changes in bombesin, substance P, somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 28:21-27, 1982.
- Merchenthaler I, Maderdrut L J, Lázár G, Gulyás J, Petrusz P: Immunocytochemical localizacion analysis of proenkephalin-derived peptides in amphibian hypothalamus and optic tectum. *Brain Res.* 416:219-227, 1987.
- Merchenthaler I, Lázár G, Maderdrut J L: Distribution of proenkephalin-derived peptides in the brain of *Rana esculenta*. *J. Comp. Neurol.* 281:23-39, 1989.
- Mitchell V, Mazzuca M, Beauvillain J C: The fetal expression of proenkephalin mRNAs and met-enkephalin immunoreactivity in the hypothalamoseptal tract and adjacent hypothalamic areas of the guinea pig brain. *Dev. Brain Res.*, 86:67-80, 1995.
- 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.
- Naujoks-Manteuffel C, Himstedt W, Gläsener-Cipollone G: Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the brain of adult and developing salamander (*Pleurodeles waltli*, *Triturus alpestris*). *Cell Tiss. Res.* 276:485-501, 1994.

- 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.
- Olson G A, Olson R D, Kastin A J: Endogenous opiates 1993. *Peptides*, 12:1407-1432, 1993.
- Palmer M R, Miller R J, Olson L, Seiger Å: Prenatal ontogeny of neurons with enkephalin-like immunoreactivity in the rat central nervous system: an immunohistochemical mapping investigation. *Med Biol*. 60:61-88, 1982.
- Pert C, Aposhian D, Snyder S: Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. *Brain Res.*, 75:356-361, 1973.
- Petrusz P, Merchenthaler I, Maderdrut J L: Distribution of enkephalin- containing in neurons in the central nervous system. En Bjorklund A and Hökfelt T, Eds. *Handbook of chemical neuroanatomy. Part I.* Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam. pp. 273-334, 1985.
- Pittius C W, Ellendorff, Höllt V, Parvizi N: Ontogenetic development of proenkephalin A and proenkephalin B messenger RNA fetal pigs. *Exp. Brain Res.* 69: 206-212, 1987.
- Polzonetti-Magni A, Carnevali O, Yamamoto K, Kikuyama S: Growth hormone and prolactin in amphibian reproduction. *Zool Sci.*, 12:683-694, 1995.
- 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.
- Reiner A: The distribution of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of turtles. *J. Comp. Neurol.*, 259:65-91, 1987.
- Rossier J, Vargo T M, Minick S, Ling N, Bloom F E, Guillemin R: Regional dissociation of B-endorphin and enkephalin content in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:5162-5165, 1977.
- Sánchez-Islas E: Estudio inmunohistoquímico de la distribución anatómica de los péptidos opioides en el cerebro del axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Tesis para obtener la licenciatura en Biología. UNAM, 1993.
- Sánchez-Islas E, Sánchez-Alvarez M, Pellicer F, León-Olea M: Immunohistochemical localization of enkephalin in the central nervous system of axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Soc. Neurosci. Abs.* 23(1): 202.8, 1993.
- Schreckenberg G M, Jacobson A G: Normal stages of development of axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Dev. Biol.* 42:391-400, 1975.
- Senba E, Shiosaka S, Hara Y, Inagaki S, Kawai Y, Takatsuki K, Sakanaka M, Iida H, Takagi H, Minagawa H, Tohyama M: Ontogeny of the leucine-enkephalin neuron system of the rat: Immunohistochemical analysis. I. Lower brainstem. *J. Comp. Neurol.*, 205: 341-359, 1982.
- Sinding C, Robinson G A and Seif S M: Neurohypophyseal peptides in the developing rat fetus. *Brain Res.*, 195:177-186, 1980.

- Slack J M: How I get eggs out of axolots. *Axolotls Newsletter*, N 13, winter 1984.
- 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.
- Stefano G B, Scharrer B, Assanah P: Demonstration, characterization and localization of opioid binding sites in the midgut of the insect (Blattaria). *Brain Res.*, 25: 205-212, 1982.
- Steiner, Doherty K, Carol R: Golgi granule processing of peptide hormone and neuropeptide precursors. *J. Cell. Biochem.*, 24:121-130, 1984.
- Swaab D F and Ter Brog J T: Developmental of peptidergic systems in the rat brain. *Ciba Found Symp.*, 81:196-217, 1981.
- Swaab D F and Martin J T: Functions of α -melanotropin and other opiomelanocortin peptides in labour, intrauterine grown and brain development. *Ciba Found Symp.*, 81:196-217, 1982.
- Terenius L: Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol.* 32: 317-320, 1973.
- Tohyama M: An overview of the ontogeny of neurotransmitters and neuromodulators in the central nervous system. En Bjorklund A and Hökfelt T, Eds. *Handbook of chemical neuroanatomy*. Vol 10: *Ontogeny of transmitters and peptides in the CNS*, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. pp. 647-650. 1992.
- Trottier T M and Armstrong J B: Hormonal stimulation as an aid to artificial insemination in *Ambystoma mexicanum*. *Can. J. Zool.* 53:171-173, 1975.
- Vaudry H, Jenks B, Oberbecke U: Biosynthesis processing and release of proopiomelanocortin related peptides in the intermediate lobe of the pituitary gland of the frog *Rana ridibunda*. *Peptides*, 5: 905-912, 1984.
- Vega R, Guevara J, León-Olea M, Soto E: Neurofarmacología e inmunorreactividad a péptidos opioides en el oído interno. XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Resúmenes de Simposios y Comunicaciones Libres, pags. 246-247. 1994.
- Watson S J, Akil H, Sullivan S O, Barchas J D: Immunocytochemical localization of methionine-enkephalin: Preliminary observations. *Life Sci.*, 25: 733-738, 1977.
- Wong M, Rius R A, Loh P Y: Characterization *Xenopus laevis* proenkephalin gene. *Mol. Brain Res.*, 11:197-205, 1991.
- Zagon I S and McLaughlin PJ: Naltrexone modulates growth in infant rats. *Life Sci* 33:2449-2454, 1983.
- Zagon I S and McLaughlin PJ: Naltrexone modulates body and brain development in rats: a role for endogenous opioids in growth. *Life Sci* 35:2057-2064,1984.
- Zagon I S and McLaughlin PJ: Naltrexone's influence on neurobehavioral development. *Pharmacol Biochem Behav* 22:441-448, 1985.

- Zagon I S and McLoughlin PJ: Opioid antagonist-induced regulation of organ development. *Physiol Behav* 34: 507-511, 1985.**
- Zagon I S and McLoughlin PJ: Opioid antagonist-induced modulation of cerebral and hippocampal development: histological and morphometric studies. *Dev Brain Res* 28:233-246, 1986.**
- Zagon I S and McLoughlin PJ: β -Funtaltrexamine (β -FNA) and the regulation of body and brain development in rats. *Brain Res Bull* 17:5-9, 1986.**
- Zagon I S and McLoughlin PJ: Identification of opioid peptides regulating proliferation of neurons and glia in the developing nervous system. *Brain Res.*, 542: 318-323, 1991.**
- Zagon I S, Isayama T, McLoughlin PJ: Proenkephalin mRNA expression in the developing and adult brain. *Mol Brain Res* 21:85-98, 1994.**
- Zagon I S, Wu Y, McLoughlin PJ: The opioid growth factor, [met 5]-enkephalin, and the ζ (zeta) opioid receptor are present in human and mouse skin and tonically act to inhibit DNA synthesis in the epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 106:490-496, 1996.**
- 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.**