

11261
2e
15

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA

EXISTENCIA Y DISTRIBUCION ANATOMICA DE PEPTIDOS OPIOIDES
EN LA HIPOFISIS DEL AXOLOTL Ambystoma mexicanum

Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias
Biomédicas, Area: Ciencias Morfológicas

MARTHA MARIA DE LA SALUD LEON OLEA

LABORATORIO DE HISTOLOGIA DE LA DIVISION DE INVESTIGACIONES,
EN NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRIA

México D.F.

1989

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.

EXISTENCIA Y DISTRIBUCION ANATOMICA DE PEPTIDOS OPIOIDES

EN LA HIPOFISIS DEL AXOLOTL Ambystoma mexicanum

INDICE

	Pág.
RESUMEN -----	1
CAPITULO I. LOS PEPTIDOS OPIOIDES	
I.1 Generalidades -----	2
I.2 Biosíntesis -----	5
Figura 1 -----	6
I.3 Liberación -----	8
I.4 Precursores -----	8
Figura 2 -----	9
Tabla I -----	10
5	
I.5 Distribución -----	11
I.6 Receptores -----	13
Figura 3 -----	14
Tabla II -----	16
Figura 4 -----	19
Tabla III -----	21
I.7 Fisiología -----	22
I.8 Los Péptidos Opioides y su relación con la Neuroendocrinología -----	23
CAPITULO II. LOS PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA	
II.1 Generalidades -----	27
II.2 Péptidos Opioides en Anfibios -----	28
II.3 Distribución de los Péptidos Opioides en la Glándula Hipófisis -----	30
CAPITULO III. CARACTERISTICAS BIOLOGICAS GENERALES DEL AXOLOTL	
Clasificación Taxonómica -----	32
Figura 5 -----	34

Figura 6	35
OBJETIVOS	37
CAPITULO IV. MATERIAL Y METODOS	38
Figura 7	42
Tabla IV	43
CAPITULO IV. RESULTADOS	45
Figura 8	47
Figura 9	47
Figura 10	48
Figura 11	49
Figura 12	50
Figura 13	51
Figura 14	52
Figura 15	53
Figura 16	54
Figura 17	55
Figura 18	57
Tabla VI	58
CAPITULO VI. DISCUSION	59
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFIA	66

RESUMEN

A partir del descubrimiento de los receptores estereoespecíficos a la morfina y de los péptidos endógenos que mimetizan su efecto, se generó un importante campo en la investigación de los péptidos opioides. En la década de los setenta y hasta nuestros días se han llevado a cabo innumerables estudios multidisciplinarios sobre estos péptidos, de los que se deriva el conocimiento de las tres moléculas precursoras que dan origen a las tres familias de péptidos opioides que se conocen. Se han propuesto como neuromoduladores o neurotransmisores que participan no sólo en los procesos de regulación de la información sensorial sino también en la memoria, el aprendizaje, en la fisiopatología del estrés, en la regulación de los procesos autonómicos y su participación en procesos patológicos como la epileptogénesis y la esquizofrenia, entre otros. Se ha demostrado la existencia de péptidos opioides en todos los niveles de la escala filogenética desde organismos unicelulares hasta el hombre. Sin embargo, se sabe poco de su localización anatómica en los anfibios, especialmente en la hipófisis de un anfibio neoténico como el axolotl Ambystoma mexicanum. En esta tesis se llevaron a cabo experimentos con técnicas de inmunofluorescencia en cortes parasagittales de cerebro e hipófisis de axolotl en las que se utilizaron antisueros contra Leucina-encefalina (Leu-e), Beta-endorfina (BE), Metionina-encefalina (Met-e) y Dinorfina (1-8) (DI) con el objeto de localizar estos péptidos en la hipófisis del axolotl. Nuestros resultados mostraron inmunoreactividad (IR) a Leu-e en células distribuidas ampliamente en todo el lóbulo anterior (AL), así como en algunas fibras del lóbulo neural (LN) y en fibras de la eminencia media (EM). Al igual que en otros vertebrados, la localización de la BE fue en todas las células del lóbulo intermedio (LI) y en algunas del LA, la IR a Met-e y a DI se encontró únicamente en fibras de la EM y del LN. La presencia de Leu-e y BE en el lóbulo anterior de la hipófisis sugiere que estos péptidos se liberan como hormonas. Por otro lado se sabe que en el anfibio Xenopus laevis el gen que codifica a la proencefalina A, no contiene la secuencia de la Leu-e, aunado a que la IR a Met-e en el lóbulo anterior de la hipófisis del axolotl fue negativa, esto sugiere que la IR a Leu-e, contenida en el lóbulo anterior proviene de la prodinorfina. Así la demostración de los péptidos opioides en la hipófisis del axolotl es relevante no sólo para el estudio de la filogenia de estos péptidos en particular, sino también para la neuroendocrinología en general, pues se han postulado como neurohormonas, con un papel importante en la neurobiología del desarrollo. Además de que el axolotl es un anfibio que permanece en estado larvario y alcanza su madurez sexual durante este período (neotenia), y es susceptible de sufrir metamorfosis; lo que lo hace un animal de experimentación idóneo para el estudio de la filogenia y de la biología del desarrollo de los péptidos opioides, importante en la biología del desarrollo.

Capítulo I

LOS PEPTIDOS OPIOIDES

I.1 Generalidades

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

La palabra opio proviene del griego que significa jugo o exudado lechoso de la adormidera Somniferum papaverin.

En 1806, Friedrich Serturmer aisló un alcaloide del opio al que le llamó morfina (Por Morfeo dios del sueño entre los griegos). En 1832, el químico francés Pierre-Jean Robiquet aisló la codeína que es un alcaloide del grupo de los fenantrenos que tiene efectos similares a la morfina. En 1848, se aisló la papaverina y a mediados del siglo XIX se empezaron a utilizar en medicina los alcaloides puros (Enciclopedia Británica, 1985).

Sin embargo las investigaciones que se hicieron sobre su modo de acción en el sistema nervioso central (SNC) fueron muy difíciles debido a su complejidad, no fue sino hasta que se utilizó el fleon aislado de cobayo, en que se pudo observar la

peristalsis provocada por incremento en la presión intraluminal la que podía ser inhibida por concentraciones de morfina equivalente a una dosis terapéutica. Posteriormente, al observar que solamente la forma levógiara de la mezcla racémica de alcaloides opiáceos provocaban los efectos analgésicos; se pensó que podrían existir sitios de unión estereoespecíficos para los opiáceos. (Goldstein y col., 1971). Fue hasta la década de los años setenta cuando se aportaron evidencias claras del funcionamiento de los opioides debido a la identificación de los receptores estereoespecíficos a la morfina por medio de ligandos sintéticos específicos como la naloxona tritiada. Estos trabajos fueron realizados simultáneamente por Terenius en Suiza y Snyder en Baltimore (1973).

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

Martin, en 1967, propuso la existencia de estos compuestos, y fue hasta 1975 en que Hughes, en experimentos

realizados con homogenados de cerebro de cerdo logró purificar una substancia que reproducía los efectos de la morfina en las preparaciones biológicas del conducto deferente del ratón y el íleon del cobayo, con la inhibición de las contracciones evocadas, este efecto era revertido por antagonistas de la morfina como la naloxona.

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

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

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

Goldstein y Col. (1975) aislaron un péptido de la hipófisis del bovino y del porcino que tenía los efectos de la morfina. En 1976 se identificó la estructura de este compuesto el que fue llamado Beta-endorfina (BE), y corresponde al fragmento 61-91 de la B-Lipotrofina (BLPH), (Bradbury y col., 1976).

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

Estos hallazgos han sido corroborados por otros autores en varias especies de vertebrados y hasta el momento se conocen

alrededor de 40 péptidos endógenos que se unen a los mismos receptores que el opio, que son agonistas de la morfina y que se sintetizan endógenamente. Estos se les conoce con el nombre de péptidos opioides, a diferencia de las sustancias derivadas del opio y sus derivados sintéticos a los que se les llama opiáceos.

I.2 Biosíntesis

Se ha establecido que los péptidos opioides biológicamente activos son sintetizados a partir de grandes moléculas precursoras, que se procesan durante su transporte intracelular para dar lugar a la molécula activa, como es el caso de las proteínas de exportación y los neuropéptidos (Steiner y col., 1980 y 1984). Este proceso biosintético incluye la transcripción, traducción en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER), transferencia de la prohormona del RER al aparato de Golgi de donde sale y se almacena en los gránulos secretorios previo a su liberación por exocitosis. El procesamiento postransduccional de la promolécula ocurre durante la migración desde el RER hacia el exterior de la célula, con pasos individuales de maduración (hidrólisis, sulfatación, glicosilación, amidación, etc.), localizados dentro de compartimientos intracelulares que contienen los sistemas enzimáticos apropiados. Estos eventos originan a los productos bioactivos y determinan el tipo de péptido que se va a producir, dando como consecuencia su potencia, selectividad por el receptor, y función (fig. 1).

Rompimiento del péptido señal,
N-glicosilización, enrrollamiento proteico, formación de uniones disulfuro

Sulfatación, O-glicosilización, Fosforilación

Acetilación
Amidación
Exoproteólisis
Endoproteólisis

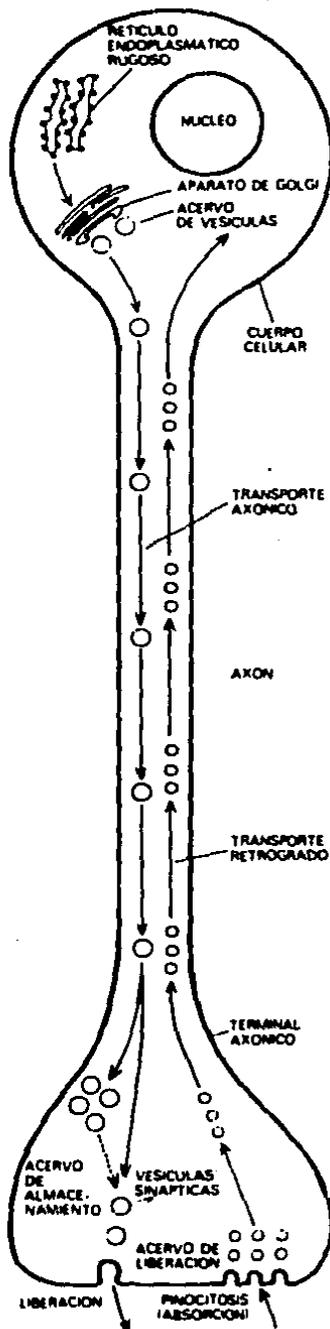


FIG. 1 Representación esquemática de algunos eventos celulares y etapas del procesamiento en la biosíntesis de los péptidos (tomada de Iversen, 1980).

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

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

Los péptidos derivados de la prodinorfina se generan por rompimientos a nivel de pares de aminoácidos básicos, por lo que

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

I.3 Liberación

La liberación de estos péptidos ha sido estudiada en experimentos "in vitro" en rebanadas de diferentes regiones cerebrales (Iversen y col., 1978; Bayón y col., 1978; Osborne y col., 1978 entre otros). Todos estos trabajos han mostrado que la liberación inducida por potasio es un proceso dependiente de calcio por lo que se asume que estos neuropéptidos se comportan como otros neurotransmisores del Sistema Nervioso Central (SNC).

I.4 Precursores

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

TABLA I

FAMILIA DE PEPTIDOS OPIOIDES

B-Endorfina (ACTH) (porcina)	Proencefalina (humana)	Prodinorfina (porcina)
<u>B-Endorfina</u>	<u>Met-Encefalina</u>	<u>Alfa-Neo-Endorfina</u>
Tri-Gli-Gli-Phe-Met- Thr-Ser-Glu-Lis-Ser- Gln-Thr-Pro-Leu- Val-Thr-Leu-Phe-Lis- Asn-Ala-Ile-Val-Lis- Asn-Ala-His-Lys- Lis-Gli-Gln	Tir-Gli-Gli-Phe-Met	Tri-Gli-Gli-Phe-Leu- Arg-Lis-Tri-Pro-lis
	<u>Leu-Encefalina</u>	<u>Beta-Neo-endorfina</u>
	Tri-Gli-Gli-Phe-Leu	Tri-Gly-Gli-Phe-Leu- Arg-Lis-Tir-Pro
	<u>Met-Encefalina-8</u>	<u>Dinorfina A-(1-8)</u>
	Tri-Gli-Gli-Phe-Met Arg-Gli-Leu	Tri-Gli-Gli-Phe-Leu Arg-Arg-Ile
	<u>Met-encefalina-Arg-Phe</u>	<u>Dinorfina A-(1-17)</u>
	Tri-Gli-Gli-Phe-Met- Arg-Phe	Tri-Gli-Gli-Phe-Leu Arg-Arg-Ile-Arg-Pro Lis-Leu-Trp-Asp- Asn-Gln
	<u>Péptido E</u>	<u>Dinorfina B-(1-13)</u>
	Tri-Gli-Gli-Phe-Met- Arg-Arg-Val-Gly-Arg- Pro-Glu-Trp-Trp-Met- Asp-Tir-Gln-Lis-Arg- Tir-Gli-Gli-Phe-Leu	Tir-Gli-Gli-Phe-Leu- Arg-Arg-Gln-Phe-Lis- Val-Val-Thr

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

Segun su estructura y como se observa en la fig. 2, las tres moléculas precursoras de péptidos opioides tienen varias características en común: a) peso molecular muy parecido, cercano a 30 000 daltons, b) número de aminoácidos similar, entre 209 y 267, c) las secuencias correspondientes a los péptidos biológicamente activos dentro de la secuencia del precursor están limitadas en ambos extremos por pares de aminoácidos básicos, y d) la región amino terminal es rica en residuos de cisteína, no incluye aminoácidos de reconocimiento proteolítico típico y está precedida por una secuencia señal de naturaleza hidrofóbica.

Estas similitudes sugieren una relación evolutiva entre las tres diferentes proteínas precursoras. Ellas representan una familia de genes y productos de genes relacionados funcionalmente. La significación biológica de los precursores de multihormonas puede ser la producción simultánea de péptidos activos los cuales pueden actuar de una manera coordinada en respuesta a alguna perturbación fisiológica. Es interesante señalar que la prodinorfina o proencefalina B contiene la secuencia de la Leu-e y carece de la secuencia de la Met-e. Este dato lo remarco ya que servirá para la discusión de los resultados de esta tesis.

I.5 Distribución

Los péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC) se han encontrado en concentraciones altas en la glándula hipófisis (Bloom y col. 1977; Mendelson y col., 1979); En el

cerebro, estos péptidos se producen en el núcleo basal medial hipotalámico en los somas neuronales y en sus proyecciones que están en muchas áreas del SNC incluyendo al sistema límbico, y al tallo cerebral. El efecto postransduccional de los precursores es diferente para la hipófisis y para el cerebro: la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y la Beta-lipotrofina (BLPH) son los productos principales en la hipófisis humana, en el cerebro es la Alfa-melanocito estimulante y la BE (Watson y Akil H., 1980; Zacarian y Smyth., 1982). La POMC es la única de los tres precursores de los péptidos opioides que da origen a otros péptidos que no tienen propiedades opioides.

La proencefalina-A contiene 7 zonas en donde se encuentra la secuencia de las encefalinas; 6 son para Met-e y 1 para Leu-e (Gluber y col., 1982; Comb y col., 1982). Este precursor se aisló primero de médula adrenal (Yang, 1980) y posteriormente de otros tejidos como son SNC y tracto gastrointestinal, en el SNC los derivados de la proencefalina-A están más ampliamente distribuidos que la BE.

La prodinorfina contiene la secuencia de la Leu-E en la porción amino terminal (NH₂); (Kakidani y col., 1979). Existen evidencias de que en la porción nigro estriatal, la Leu-e que contienen las neuronas de esta región proviene de la Prodinorfina, (Zamir y col., 1984). La inmunorreactividad a dinorfinas se ha encontrado especialmente en el área hipotalámica principalmente en las neuronas que contienen vasopresina en el núcleo magno celular y que proyectan a la

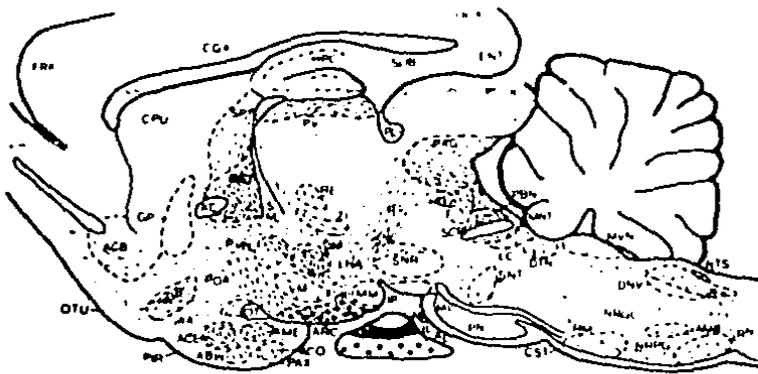
neurohipófisis (LN) (Watson y col., 1981; Weber y col., 1981). Estudios de inmunocitoquímica con microscopía electrónica demuestran que en estas neuronas del núcleo magnocelular la dinorfina 1-8 que contienen, está en las mismas vesículas que la vasopresina y la vasopresina asociada a neurofisisina. La inmunorreactividad a dinorfinas se ha encontrado también en tallo cerebral, amígdala y tracto gastrointestinal.

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

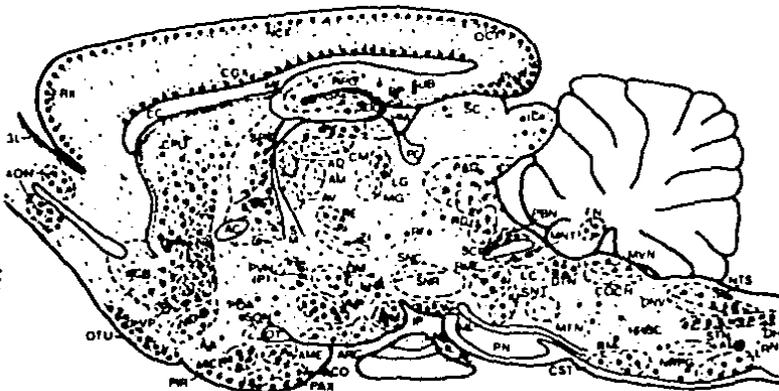
1.6 Receptores

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

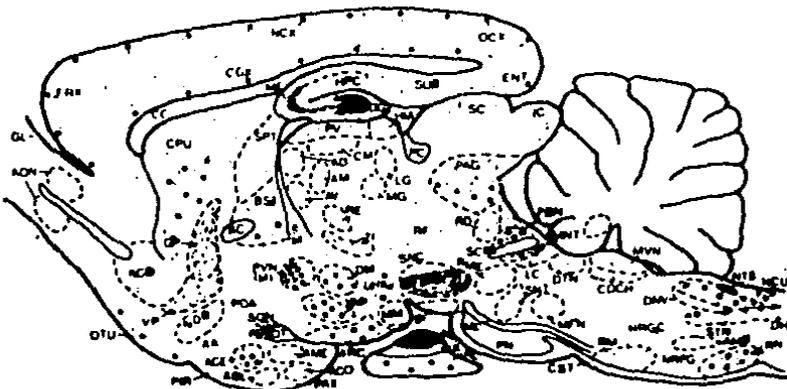
Muchos de los estudios recientes sobre los receptores a los péptidos opioides han tratado de definir y caracterizar los diferentes tipos de receptores. La existencia de clases separadas



PROOPIOMELANOCORTINA



PROENCEFALINA



PRODINORFINA

FIG. 3 ANATOMIA DE LOS SISTEMAS OPIOIDES EN EL SNC.

Figura 3 representación esquemática de la distribución de los péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina, proencefalina y prodinorfina en el Sistema Nervioso Central de la rata, determinado por estudios inmunohistoquímicos. En estos tres mapas parasagitales, los pericarios neuronales son demostrados como círculos sólidos y las fibras terminales como líneas curvas y puntos.

SÍMBOLOS

AA: amígdala anterior, ABL: núcleo basolateral de la amígdala, AC: comisura anterior, ACB: núcleo acumbens, ACE: núcleo central de la amígdala, ACC: núcleo cortical de la amígdala, AD: Núcleo anterodorsal del tálamo, AL: lobulo anterior de la pituitaria, AM: núcleo anteromedial del tálamo, AMB: núcleo ambiguo, AME: núcleo medial de la amígdala, AON: núcleo olfatorio anterior, ARC: núcleo arcuato, AV: núcleo anteroventral del tálamo, BST: núcleos basales de la stria terminalis, CC: cuerpo calloso, CGX: corteza del cíngulo, CM: núcleo centro-medial del tálamo, COCH: complejo nuclear coclear, CPU: caudo-putamen, CST: tracto corticoespinal, DH: dorsal de la médula espinal, DG: girus dentado, DM: núcleo dorsomedial del hipotálamo, DNV: núcleo motor dorsal del vago, DNT: núcleo tegmental dorsal, ENT: corteza entorrinal, FM: núcleo fatigal del cerebelo, FRX: corteza frontal, GL: capa glomerular del bulbo olfatorio, GP: globo pálido, HM: núcleo habenular medial, HPC: hipocampo, IC: colículo inferior, IL: lóbulo intermedio de la pituitaria, IP: complejo nuclear interpeduncular, LC: núcleo del locus coeruleus, LG: núcleo geniculado lateral, LHA: área hipotálmica lateral, LRN: núcleo reticular lateral, MF: fibras musgosas del hipocampo, MFN: núcleos faciales motores, MG: núcleo geniculado medial, ML: lemnisco medio, MM: núcleos mamilares mediales, MNT: núcleos mesencefálicos del trigémino, MVN: núcleo vestibular medial, NCU: núcleo cuneatus, NCX: neocorteza, NDB: núcleo de la banda diagonal, NL: lóbulo neural de la pituitaria, NRGC: núcleo reticularis gigante celularis, NRPG: núcleo reticularis paragigantocelularis, NTS: núcleo del tracto solitario, OCX: corteza occipital, OT: tracto óptico, OTU: tubérculo olfatorio, PAG: gris periacueductal, PAX: corteza periamigdalóide, PBN: núcleo parabraquial, PC: comisura posterior, PIR: corteza piriforme, PN: puente, POA: área preóptica, PP: ruta perforante, PV: núcleo periventricular del tálamo, PVN(M): núcleo paraventricular (pars magnocelularis), PVN (P) núcleo paraventricular (pars parvocelularis), RD: núcleo rafé dorsalis, RE: núcleo reuniens del tálamo, RF: formación reticular, RM: núcleo magno del rafé, RME: núcleo mediano del rafé, SC: coliculus superior, SCP: pedunculus cerebelar superior, SM: estria medularis del tálamo, SNC: sustancia negra, SNR: sustancia negra pars reticulata, SNT: núcleo sensorial del trigémino (principal), SON: núcleo supraóptico, SPT: núcleo septal, STN: núcleo espinal del trigémino, SUB: subiculum, VM: núcleo ventromedial del hipotálamo, VP: pálido ventral, ZI: zona incerta. Tomado de Khachaturian y col., (1985).

de receptores fue propuesta primero por Martín y col. (1976), con base a las diferentes respuestas fisiológicas obtenidas al probar diversos tipos de opiáceos con la preparación de perro espinal crónico. Ellos propusieron tres tipos de receptores mu (μ) para los compuestos como la morfina, kappa (κ) para las drogas como la cetociclazocina y sigma (σ) para las drogas como la N-alilnormetazocina. Además de estos tipos de receptores Kosterlitz y col. (1979) dieron evidencias sobre un cuarto tipo de receptor al que denominaron delta (δ).

Los resultados de los experimentos farmacológicos fueron corroborados en ensayos de unión a receptor y los estudios de autorradiografía demostraron que los receptores mu, delta y kappa son distintos sitios de unión, que se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC de diferentes especies animales. (Chang y col., 1979; Pert y col., 1975; Bonnet y col., 1981; Lewis y col., 1982; Ninkovic y col., 1981). Estos estudios y los de desplazamiento competitivo son de gran importancia para establecer la especificidad funcional de cada tipo de receptor. Gracias a esto, se han podido desarrollar drogas selectivas para cada uno de ellos por ejemplo, drogas que causen analgesia, pero no depresión respiratoria. Una de las clasificaciones propuestas está en la tabla 2 (Martín W.R., 1983).

TABLA II

TIPOS DE RECEPTORES PROPUESTOS

Tipo de Receptor	Características Farmacológicas Agonistas	Péptido Agonista	Tejido
Mu	Morfina	?	Conejillo de Indias
Delta	-----	Enkefalinas	Conducto deferente de ratón
Kappa	Cetociclazocina	Dinorfina	Conducto deferente de conejo
Sigma	n-Alilmetazocina	?	-----
Epsilon	-----	Beta-Endorfina	Conducto deferente de rata

Modificada de Copolov (1985).

El receptor clásico para la morfina es el mu y es antagonizado por la naloxona, (Chang y Cuatrecasas P., 1979). Se han identificado 2 tipos de receptores mu: mu 1 de alta afinidad que se une a morfina y a los opioides, y mu 2 de baja afinidad que se une principalmente a la morfina (Pasternak G.W., 1982).

Las enkefalinas muestran una afinidad preferencial por los receptores delta (Lord y col., 1977); estos receptores no han sido estudiados de manera sistemática en el animal íntegro. Sin embargo, se sabe que juegan un papel importante en la depresión respiratoria (Freye E. y col., 1982) y parecen no mediar la analgesia.

Los receptores kappa se han postulado para las drogas del tipo de la ketazocina, su acción analgésica es pobre y disminuye

o suprime el síndrome de abstinencia (Martin W.E. y col., 1976). Cuando el péptido crece en longitud hacia el carboxilo (COOH)-terminal de la Leu-e se va perdiendo la selectividad a los receptores delta y se va incrementando la selectividad a los kappa (Paterson y col., 1983); así la dinorfina, la alfa y beta-neoendorfina son agonistas kappa.

Los receptores menos conocidos son los sigma; sin embargo, son los que tienen más interés para la psiquiatría clínica ya que las drogas agonistas sigma tienen potentes efectos psicomiméticos.

La existencia de los receptores épsilon han sido propuestos para la BE, en contraste con los ligandos clásicos mu y delta que tienen una alta potencia en el conducto deferente de la rata.

La lista de los subtipos de receptores putativos para los opioides es cada vez más grande. Esto puede sugerir la existencia de un solo tipo de receptor, que tenga diferente afinidad para varios ligandos (Lee y Smith, 1980) dependiendo de los factores variables que existen entre los diferentes tejidos y entre las especies.

Las investigaciones para los receptores a péptidos opioides deben incluir el desarrollo de antagonistas específicos y la necesidad de conocer la base de la heterogeneidad de los receptores y la relación entre los ligandos endógenos y las

formas diferentes del receptor.

Se ha visto que hay una correlación alta entre las densidades a los receptores opioides en diferentes regiones del cerebro y la médula espinal de mamíferos y la densidad de péptidos opioides contenidos en somas y fibras neuronales en las mismas regiones. Sin embargo, hay regiones en donde la correlación entre ellos es aparentemente baja. Para hacer clara esta discrepancia se requiere de anticuerpos específicos para péptidos opioides y sus precursores así como de autorradiografía de alta resolución para poner en evidencia las diferentes clases de receptores, y la distribución de las enzimas responsables de la degradación de estos péptidos (fig. 3 y 4).

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

Figura 4 representación esquemática de receptores opioides mu, delta y Kappa en el cerebro de la rata, determinado por técnicas de autoradiografía de receptor. Para facilitar la descripción de estas distribuciones, las densidades, del receptor fueron coloreadas de acuerdo al siguiente código, con rojo= muy denso (++++), naranja=denso (+++), verde=moderado (++) , y azul=ligero (+). Estos términos no son cuantitativos y sólo dan una medida relativa de la distribución de un receptor.

SIMBOLOS

ABL, núcleo amigdalino basolateral; AC, comisura anterior; ACB, núcleo acumbens; ACE, núcleo central amigdalino; AD, tálamo anterodorsal; AL, lóbulo anterior de la pituitaria; AME; núcleo amigdalino medio; AON, núcleo olfatorio anterior; ARC, núcleo arcuato, del hipotálamo; BST, núcleos basales de la estria terminalis; cc, cuerpo calloso; ce, canal central; CL, tálamo centrolateral; CM, tálamo centromedial; CPU, caudo putamen; CRB, cerebelo; DG, giro dentado; DH, hueso de la espina dorsal; DMH, hipotálamo dorsomedial; DPG, materia gris; CS, colículo superior; FCX, corteza frontal; Ica, islotes de calleja; IGR, capa granular intermedia, bulbo olfatorio; IL, lóbulo intermedio; IMD, tálamo intermedio dorsal; ING, capa gris intermedia, colículo superior, IP, núcleo interpeduncular; IPL, capa plexiforme intermedia, bulbo olfatorio; LC, locus coeruleus; LD, tálamo laterodorsal; LHA, área hipotalámica lateral; LP, tálamo latero posterior; LRN, núcleo reticular lateral; LS, septum lateral; MD, tálamo dorsomedial; ME, eminencia media; MG, geniculado medial; ML, lemnisco medio; MM, núcleos mamilares mediales, MS, septum medial; NV, Núcleo vestibular medial; NDB, núcleo de la banda diagonal; NL, Lóbulo neural de la pituitaria; NRG, núcleo reticularis gigante celularis; NTS, núcleo del tracto solitario; OB, bulbo olfatorio; OT, tracto óptico; OTV, tubérculo olfatorio; PVN, núcleo parabraquial; PC, comisura posterior, PCX, corteza parietal; PN, puente; POA, área preóptica; PrS, presubiculum; PV, tálamo paraventricular; PVN, hipotálamo paraventricular; RD, rafe dorsal; RE, núcleo reuniens del tálamo, RM, núcleo magno del rafe; RME, núcleo mediano del rafe; SC, colículo superior; scp, pedúnculo cerebelar superior; SG, sustancia gelatinosa; SNC, sustancia negra compactada; SNR, sustancia negra reticulada; STN, núcleo sensorial del trigémino; SON, núcleo supraóptico; STCX, corteza estriada; SNT, núcleo espinal del trigémino; SUG, capa gris superficial, colículo superior; TCX, corteza temporal; VH, ventral, médula espinal; VL, tálamo ventrolateral; VM, tálamo ventromedial; VMH, hipotálamo ventromedial; VP, pálido entral; VPL, tálamo ventroposterolateral; y ZI, zona incerta.
Tomada de Mansour y col. (1988).

TABLA III

Distribución de Receptores y Péptidos Opioides en el Cerebro de la Rata.

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

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

1.7 Fisiología

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

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

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

Desde su descubrimiento las encefalinas y las endorfinas, que son péptidos endógenos con propiedades parecidas a la morfina, han sido examinadas por sus cualidades analgésicas. Sin embargo, gracias a las numerosas investigaciones realizadas desde la década pasada se ha establecido la participación de estos péptidos en muchas otras funciones, como en los procesos de modulación de la información sensorial, en la fisiopatología del estrés, en la regulación de los sistemas cardio-vascular, respiratorio, gastro-intestinal, renal y

neuroendócrino, en la termorregulación, en la regulación de la ingesta de alimentos e hidratación, en la regulación de funciones como la conducta sexual, la locomoción, el crecimiento, memoria y aprendizaje, y su participación en desórdenes mentales y neurológicos como la esquizofrenia, y la epileptogénesis. De manera reciente se les ha relacionado también con el sistema inmunológico y el desarrollo del cáncer. (ver revisión de Olson y col. 1988).

1.8 Los péptidos opioides y su relación con la neuroendocrinología

Existen evidencias de una modulación opioidérgica en la secreción de hormonas hipofisarias en el hombre y en vertebrados inferiores. Se ha visto que en el hombre, estos péptidos juegan un papel importante con respecto a la liberación de gonadotropinas, ACTH y vasopresina.

El control opioidérgico sobre las gonadotropinas en el hombre es posiblemente de carácter inhibitorio. Esto es consistente con el hecho de que las mujeres con adicción al opio presentan amenorrea (Gailden y col., 1964). Con agonistas y antagonistas opioides se han visto efectos sobre la hormona luteinizante (LH), y la folículo estimulante (FSH). Estos efectos son más notables sobre la LH y su magnitud varía dependiendo de la fase menstrual, dosis bajas de naloxona incrementan su concentración (Ropert y col., 1981;

Ellingboe y col., 1982), y tienen su máximo efecto en la mitad de la fase luteínica (Ovigley y Yen, 1980, Blankstein y col., 1981) y su efecto mínimo en el inicio de la fase folicular. Se ha sugerido que el control opioidérgico sobre la LH es mediado por la modulación de la hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica, (GnRH), ya que la naloxona no induce la liberación de la LH, cuando existe daño hipotalámico (Blankstein y col., 1981). Algunos estudios hechos en rata han postulado que la secreción de la GnRH es mediada por la interacción de neuronas opioidérgicas y catecolaminérgicas, (Kalra S.P. y Kalra P.S., 1984). También ha sido reportado que la naloxona previene la elevación de la prolactina asociada con el ejercicio vigoroso. Además los niveles de BE en el plasma se elevan con el ejercicio (Colt y col., 1981); ésto sugiere que la amenorrea de las atletas se debe a un efecto del incremento tónico de los opioides sobre la función hipotalámica.

La acción de los péptidos endógenos sobre la liberación de la ACTH parece estar mediada a través del hipotálamo y de otras áreas cerebrales, ya que los opioides no alteran la liberación de la ACTH de la hipófisis cuando se aplican directamente (Buckingham y Cooper, 1984).

Algunas disfunciones en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales alteran la sensibilidad a los opioides, como la enfermedad de Addison que se asocia a un incremento en la supresión de la ACTH en respuesta a la aplicación de análogos de las encefalinas (Allolio y col.,

1982). En la enfermedad de Cushing y en el síndrome de Nelson, el efecto inhibitorio de los agonistas opioides sobre la liberación de ACTH presenta una resistencia variable (Gaillard y col., 1981).

La coexistencia de la dinorfina y la vasopresina en las vesículas neurosecretorias de las neuronas magnocelulares ha hecho de interés el estudio de las posibles funciones de los péptidos derivados de la dinorfina en las funciones neurohipofisarias.

Los agonistas kappa producen diuresis en los animales con hidratación normal (Leander, 1983, Slizgi y col., 1982). Este efecto se debe probablemente a la inhibición de la liberación de la vasopresina en la neurohipófisis (Iversen L.L. y col., 1980, Grossman y col., 1980). La especificidad de la dinorfina por los receptores kappa, además de la colocación de la dinorfina-vasopresina ha planteado el concepto de que hay autorreceptores kappa sobre las neuronas magnocelulares (Leander, 1983). Esto se ha propuesto ya que los péptidos derivados de la dinorfina al ser co-liberados con la vasopresina ocupan estos autorreceptores y provocan un efecto inhibitorio sobre la liberación posterior de vasopresina por la célula (Martin y Voigt, 1981). Lightman y col. (1983) han demostrado un aspecto de esta hipótesis ya que han encontrado que en la neurohipófisis existen este tipo de receptores que podían estar en los pituitarios gliales liberadores, así como sobre terminales neurosecretoras, por lo que el efecto de los opioides sobre la

liberación de la vasopresina dependería de la interacción axón pituitario.

Se ha propuesto también que la liberación de la hormona de crecimiento es estimulada por la administración de BE y morfina (Rivier y col., 1977; Bruni y col., 1977; Chihara y col., 1978). La liberación de TSH es inhibida por la Met-e en ratas. Sin embargo el estudio de los efectos de los opioides en el sistema neuroendócrino ha sido difícil de evaluar; los resultados más consistentes son los obtenidos sobre las hormonas del lóbulo anterior como la hormona de crecimiento y la prolactina, hecho en el que muchos investigadores están de acuerdo ya que la BE es eficiente como factor liberador de ambas hormonas a nivel hipotalámico.

Por otra parte la presencia de péptidos opioides en hipotálamo, hipófisis, sistema límbico, sistema nervioso autónomo y médula adrenal sugieren que estos péptidos están involucrados en los procesos y respuestas fisiológicas del estrés.

Capítulo II

LOS PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA

II.1 Generalidades

Los péptidos opioides y sus receptores se han encontrado no sólo en los mamíferos, sino también en muchos otros organismos a lo largo de la escala filogenética, desde organismos unicelulares (Leroith y col., 1982), pasando por invertebrados, protocordados, y vertebrados hasta el hombre. (Gustafsson y col., 1986; Leung y Stefano, 1984; Cone y col., 1983; Takahashi y col., 1984; Pestarino M., 1985; Bayón y col., 1980; Brauth S., 1984; entre otros).

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

col.,1988).

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

Por los estudios de union estereoespecífica de alta afinidad para ligandos opioides con propiedades similares a las del tejido nervioso se ha encontrado que éstos están presentes en vertebrados inferiores, moluscos y otras especies de invertebrados (Stefano y col., 1980; Stefano y col., 1982). Estas observaciones implican que hubo un desarrollo evolutivo temprano y una continuidad filogenética de los péptidos opioides y sus receptores. Además por estudios recientes de Zipser y col. (1985) efectuados por cruzamiento molecular, sugieren que los receptores opiáceos han permanecido estables a través de la escala evolutiva.

II.2 Péptidos opioides en anfibios

Como se describió en el inciso anterior, los péptidos opioides y sus receptores se encuentran en organismos en todos los niveles de la escala filogenética, sin embargo es hasta los anfibios en que existen evidencias de que las proteínas

precursoras de los péptidos opioides son estructuralmente homólogas a las de los mamíferos (Martens y col., 1985).

Martens y col. en 1984 en la rana Xenopus laevis examinaron por medio de técnicas de biología molecular el gene que codifica la proencefalina, encontrando que la estructura primaria de los principales exones de los genes de la proencefalina codifican 7 secuencias de Met-e, pero ninguna secuencia de Leu-e. Las posiciones de la Met-e dentro de la secuencia de la pro-encefalina son las mismas que en la secuencia de la pro-encefalina de mamíferos, pero el lugar que le correspondería a la Leu-e está ocupado por una copia de Met-e. Por lo tanto en la pro-encefalina del Xenopus laevis no está contenida la secuencia de la Leu-e.

La presencia de POMC y sus derivados se han encontrado en el lóbulo neurointermedio de la hipófisis de la rana Xenopus laevis y la Rana rudibunda (Vaudry y col., 1984). Leboulenger y col. en 1986 demostraron la presencia de encefalinas en los gránulos cromafines de la rana. Con la técnica de cromatografía de filtración en gel sobre extractos ácidos de cerebro de Bufo marinus se encontraron Met-e, Leu-e, y heptapéptido libres. La presencia del heptapéptido es una evidencia de que existe la pro-encefalina en los anfibios. La dinorfina (1-13) está presente en la hipófisis, cerebro y médula espinal del sapo Bufo marinus (Kilpatrick y col., 1983).

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

II.3 Distribución de los Péptidos Opioides en la Glándula Hipófisis.

Se ha reportado la existencia y las posibles funciones de los péptidos opioides en diferentes especies (Bentley y Wallis., 1986; Bloom y col., 1977; Rossier y col., 1979) se ha observado que su distribución en los diferentes lóbulos hipofisarios varía en especies distintas y también durante el desarrollo. Las encefalinas y las dinorfinas se encuentran en el lóbulo neural, tanto en aves como en mamíferos (Cone y Goldstein, 1982; Goldstein y Ghazorossian., 1980; Bayón y col., 1980). La dinorfina y la BE se han localizado en el lóbulo intermedio (Cone y Goldstein., 1982; Goldstein y Ghazorossian, 1980; Frata y col., 1979; Rossier y col., 1977; Bayón y col., 1980).

Sin embargo, existe cierta controversia en la existencia de la dinorfina en el lóbulo anterior de la hipófisis. Así, Schwenk y col. (1989) reportan altas concentraciones de este

péptido en el lóbulo anterior de la rata; sin embargo, Goldstein y col. (1980) reportan muy pequeñas cantidades de dinorfina en el lóbulo anterior de este animal y no existe en el del Buffo marinus (Cone y Goldstein., 1972).

El único reporte de la existencia de encefalinas en la meta-adenohipófisis, que corresponde al lóbulo intermedio en los mamíferos, es el de Dore y col. (1984) en la lamprea.

Recientemente Assai y col. (1988), con técnicas de radio-inmuno-análisis (RIA), demostraron que en el Ambystoma mexicanum el contenido de encefalinas en la hipófisis total es mucho mayor que la contenida en el telencéfalo de la rata y con una proporción de 2.2 de Met-encefalina por 1 de Leu-encefalina (pmol por g de tejido), la proporción es diferente para lo encontrado en mamíferos que es de 4 Met-encefalinas por 1 Leu-encefalina.

CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS GENERALES DEL AXOLOTL

Clasificación Taxonómica:

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

(Weichert C. y Presch W., 1981)

Durante la evolución de los vertebrados es en la clase de los anfibios donde se encuentra la etapa de transición entre la respiración por medio de branquias en el agua a la respiración pulmonar, y el desplazamiento mediante la natación hacia la locomoción.

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

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

Existen diferentes subespecies o razas de Ambystoma mexicanum; sin embargo, la más conocida es la del axolotl obscuro del Lago de Xochimilco y la del Ambystoma tigrinum que se encuentra en los Estados Unidos, Suroeste de Canadá, en la ciudad de Puebla y Michoacán.

El nombre vernáculo del Ambystoma mexicanum es Axolotl, de origen azteca y significa monstruo o agave de doble tallo. Se relaciona con el contexto de lo "feo", en relación al mito del Dios Xolotl que se supone adoptaba formas feas y precedía el nacimiento de gemelos y monstruos (Smith M. y Smith B., 1971).

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

El género Ambystoma es intermedio entre las especies de Urodelos y Anuros de la clase de los anfibios. Se parece a los peces, pero su cerebro está organizado en un plano mayor, lo cual hace posible su comparación con los reptiles y mamíferos. Desde los estudios de Herrick, (1948) se sabe que el SNC contiene



FIGURA 5. Aspecto general del axolotl Ambystoma mexicanum .

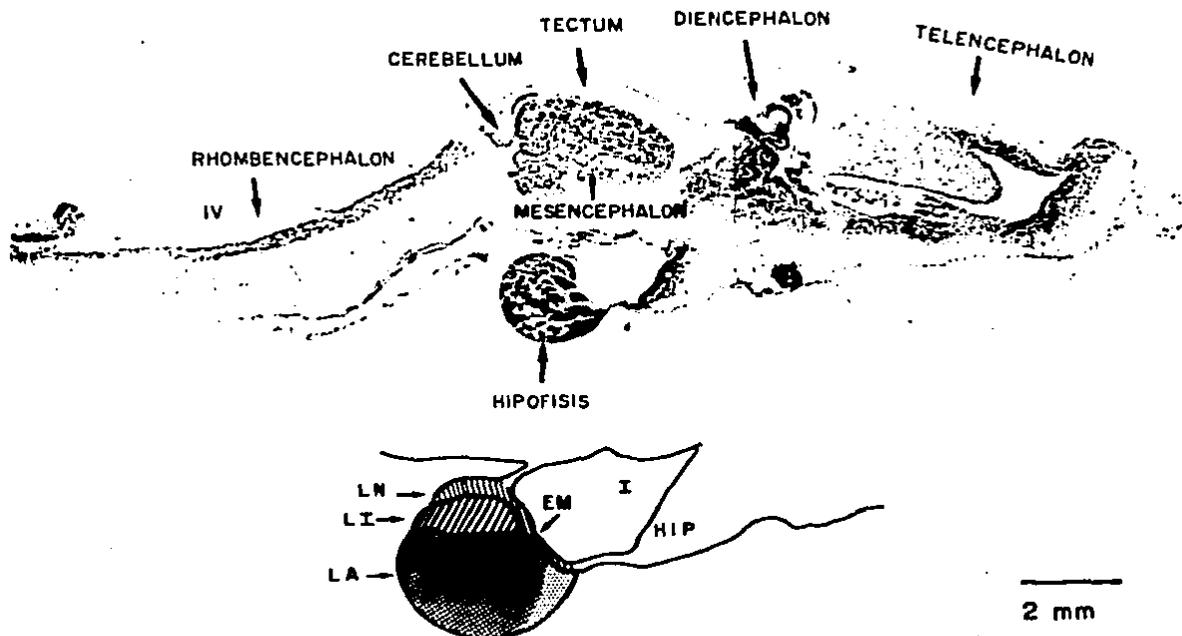


FIGURA 6. Fotomontaje de un corte parasagital de 10 μ m. de espesor del cerebro e hipófisis del axolotl (arriba) donde se muestran las diferentes estructuras cerebrales (Nissl). Esquema de la hipófisis en donde se muestran sus diferentes lóbulos (abajo).

ya representadas las partes del SNC de los vertebrados "superiores" como son: telencéfalo, en donde sobresale el tamaño de los ventrículos; el diencéfalo, el cual se divide en : tálamo hipotálamo y epitálamo; el mesencéfalo con colículos superior e inferior y la división de tectum y tegmentum, y el rombencéfalo (fig. 6).

La hipófisis del axolotl está situada por debajo de la parte ventral del mesencéfalo, mide de diámetro antero-posterior

de 2.3 a 2.7 mm y de diámetro lateral de 2 a 2.5 mm; está formada por 3 lóbulos: el lóbulo posterior o neurohipófisis (LN), el lóbulo anterior o adenohipófisis (LA) y el lóbulo intermedio (LI).

El lóbulo nervioso se divide en tres regiones: la más rostral es la eminencia media, que forma parte de la pared del hipotálamo y está en aposición con la adenohipófisis y conectada con ella por medio de los vasos portales. La eminencia media se continúa con la neurohipófisis, formada por pituicitos y terminaciones nerviosas provenientes del hipotálamo, principalmente del núcleo preóptico en donde se origina el tracto hipofisial, pasa por la eminencia media y llega al lóbulo nervioso en donde forma un neuropilo denso, menos abundante en el lóbulo intermedio y algunas de estas fibras penetran al lóbulo anterior, terminando en pequeños bulbos que descansan sobre las células glandulares. El lóbulo nervioso es una hoja bastante delgada de epitelio invaginado que forma la pared posterior dorsal del amplio infundíbulo, este epitelio forma cordones irregulares y en el eje de cada uno de ellos hay un asa capilar. Este tracto hipotálamico hipofisiario sirve para el control nervioso de la actividad endócrina. El lóbulo intermedio está bien diferenciado y el lóbulo anterior en el caso del axolotl es la porción más caudal. Está formado por cordones de células glandulares dispuestas entre los espacios vasculares (fig. 6).

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es buscar la existencia de péptidos opioides en un organismo anfibio neoténico que permita estudiar la filogénia y ontogénia de los péptidos opioides como: la Leu-encefalina, Beta-endorfina, Met-encefalina y dinorfina (1-8), así como las características morfológicas de las células que los contienen y su distribución anatómica en el tejido hipofisiario.

La especie que cumple con estas características es el axolotl Ambystoma mexicanum, en las que se realizaron los experimentos de esta tesis que a continuación detallaremos.

Capítulo IV

MATERIAL Y METODO

Los axolotls fueron capturados en el lago de Xochimilco en México, D.F. y mantenidos en un acuario abierto con una temperatura de 18 a 20 °C con un ciclo artificial de 10 horas luz y 14 horas oscuridad, con una alimentación a base de peces vivos, polvo de mosco y pedazos de hígado de pollo.

Se utilizaron 30 animales, machos y hembras, de entre 80 y 120 g. de peso y de 18 a 20 cm de longitud. Se anestesiaron por inhalación de éter etílico por 10 a 15 minutos y se perfundieron por vía intra-cardíaca, primero con una solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) 0.1 M pH 7.4, aproximadamente 250 ml, y luego se colocaron en una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M pH 7.4 500 ml. La disección del cerebro y la hipófisis se llevó a cabo por la parte dorsal de la cabeza. Se separó la piel y tejido celular subcutáneo, se removió el cartílago que forma el cráneo, se cortaron los nervios craneanos y se extrajo el cerebro y la hipófisis unidos. Se postfijaron por 3 horas en la misma solución fijadora después de la cual las piezas se equilibraron en sacarosa al 12%, 16% y 18% (Bayón y col. 1980); posteriormente se incluyeron en "tissue tek" (medio de inclusión

hidrosoluble, Laboratorios Miles) y se congelaron rápidamente a -20°C . Se efectuaron cortes parasagittales de $10\ \mu\text{m}$ de espesor del cerebro y la hipófisis con el crióstato a una temperatura de -16 a -18°C , se montaron directamente en portaobjetos previamente preparados con gelatina-cromoalúmina.

Se montaron de la siguiente manera se numeraron los portaobjetos entre 20 y 24 y cada corte se montó en diferente portaobjetos, el primero en el portaobjetos número 1, el segundo en el 2 y así sucesivamente hasta llegar al último portaobjetos. Después se inició nuevamente con el primer portaobjetos hasta obtener 3 o 4 cortes en cada uno de los portaobjetos, esto con el fin de obtener cortes seriados en diferentes portaobjetos que fueron incubados con diferentes anticuerpos y controles para que pudieran ser comparados.

Especificaciones de los Antisueros

Se utilizaron antisueros policlonales contra Leu-e, BE, Met-e y DI. Los antisueros para Leu-e y Met-e fueron donados por el QFB Miguel Asai del IMP, fueron desarrollados en conejos de Nueva Zelanda, inmunizados previamente con cada uno de los pentapéptidos Leu-e y Met-e unidos a albúmina sérica bovina (BSA) y glutaraldehído siguiendo el protocolo de inmunización descrito por Vindrola y col. (1981).

Bajo condiciones de radioinmunoanálisis el antisuero para Leu-e presentó un 5.9% de cruzamiento con la Met-e; 1.4% con la DI 1-13, y menos de 0.01% de cruzamiento con Alfa, Beta y Gama endorfinas.

El anti-Met-e presentó un 100% de cruzamiento con (Met (O) encefalina); 0.3% con Leu-e y menos de 0.01% con Met-encefalina-Arg2, Leu-encefalina-Arg6, Dinorfina 1-13, Alfa, Beta y Gama endorfinas (Assai y col., 1988).

Bajo condiciones inmunohistoquímicas y utilizando una dilución de 1:100 el anti-Leu-e mostró un cruzamiento muy leve con Met-e y con DI (tabla 4). Estas pruebas se hicieron preadsorbiendo en un tubo de ensayo el antisuero a la dilución de trabajo con los diferentes péptidos sintéticos (Laboratorios Sigma) Leu-e, BE, Met-e y DI e incubando esta solución en el tejido en lugar del primer anticuerpo. Se valoró dependiendo de los cambios que ocurrieron con la inmunorreactividad específica comparada con otro corte de tejido que tuviera IR positiva.

El anti-Met-e a una dilución de 1:100 cruzó muy levemente con Leu-e; no se observaron cambios en la IR preadsorbiendo con BE y con DI.

Se utilizaron 2 antisueros para BE, uno de ellos donado por el Dr. Bloom, y el otro comercial (Laboratorios ICN). Estos anticuerpos reconocen el segmento carboxilo terminal del péptido, por lo que cruza totalmente con la Beta-lipotopina (B-LPH), y no cruza con los péptidos derivados de la Pro-enK-A o B.

Se utilizaron 2 antisueros para la DI 1-8, uno comercial (Immunonuclear Corp.) y el otro donado por el Dr. Iadarola; bajo condiciones de RIA, no cruzó con Met-e, Met-e (Arg 6) Met-e (lis 6), Leu-e, Leu-e (Arg 6), Leu-e (Arg 6, Arg 7), Alfa-neoendorfina, dinorfina 1-13 y 1-17. En el tejido, a una concentración de 10 a la -4 M cruzó levemente con Leu-e. (Iadarola y col., 1986; Ruda y col., 1988).

En un principio se realizaron experimentos en los que se utilizaron diluciones crecientes de los diferentes antisueros resultando esto en una disminución gradual hasta la desaparición de la tinción inmunológica con el fin de determinar la dilución óptima de trabajo, siendo ésta de 1:100 para el anti-Leu-e, para el anti-BE 1:50, para el anti-Met-e 1:100 y para el anti-DI 1:500. Las diluciones se hicieron con solución amortiguada de fosfatos (PB) 0.1 M pH 7.4 más tritón X 100 a una concentración de 0.3%.

-Se dejaron secar las laminillas por 30 minutos.

-Lavado del tejido con PBS con 0.3% de Tritón X 100 por 10 minutos.

-Incubación del primer Anticuerpo (Ac), en cámara húmeda a 4°C por 24 h.

-Lavado del tejido con PBS tritón.

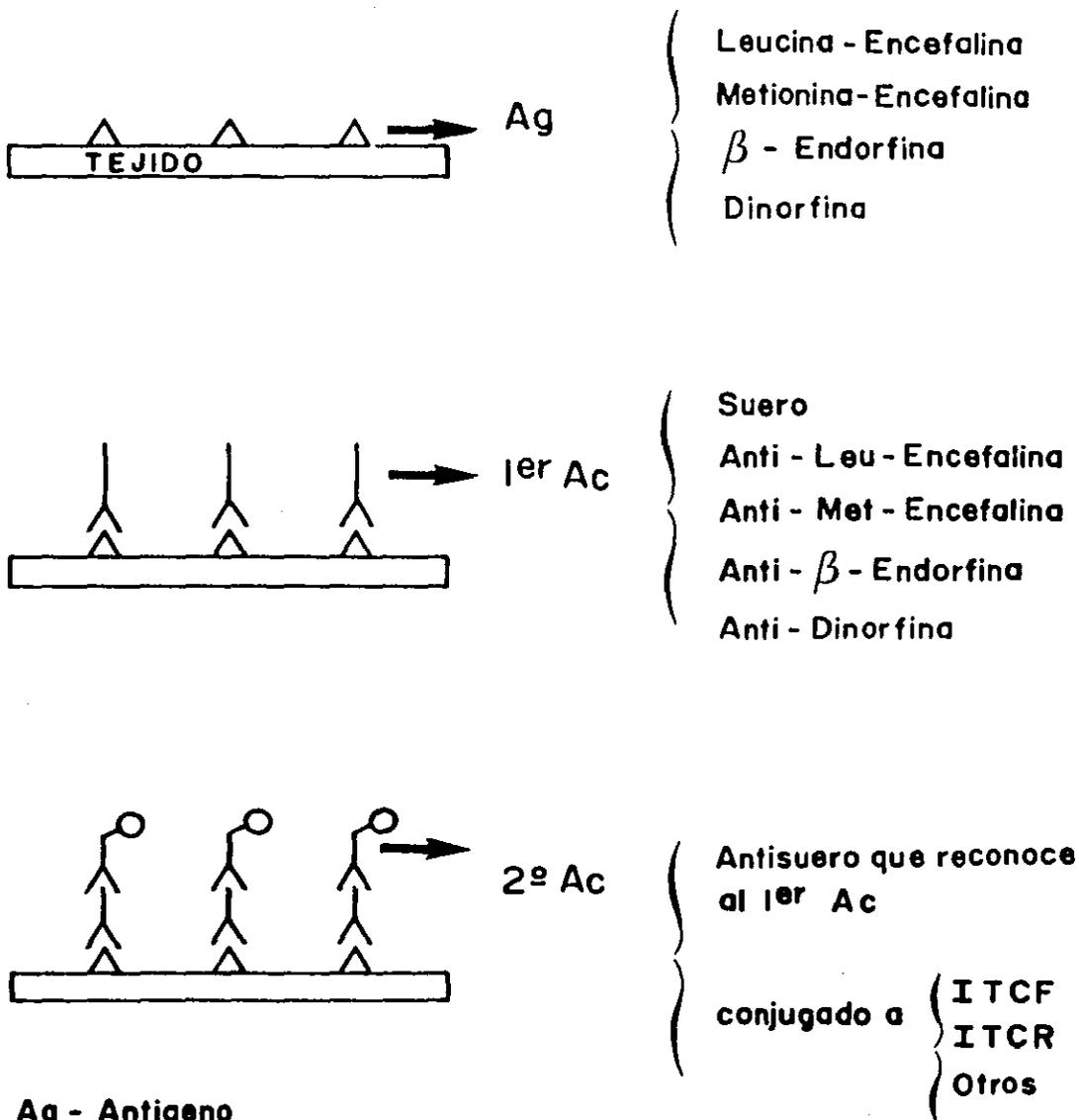
-Incubación con el segundo Ac. en cámara húmeda a 37° C. por 2 h. (IGg H+L hecho en cabra contra conejo y conjugado a isotiocianato de fluoresceína o rodamina Lab. ICN) en una dilución de 1:100.

-Lavado del tejido con PB.

-Se montó con glicerina.

(fig. 7).

Técnica Indirecta de Inmunofluorescencia



Ag - Antígeno

Ac - Anticuerpo

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

Se realizaron diferentes controles: a) omisión del anticuerpo primario, b) omisión del segundo anticuerpo, c) preadsorción del anticuerpo primario con un exceso (10 a la ⁻⁴ M) de su péptido sintético específico), d) control Buffer, (todo el experimento se corrió únicamente con PB tritón, esto es para observar la fluorescencia nativa).

Los controles de especificidad de los antisueros por preadsorción se sintetizan en la tabla 4.

TABLA IV

EFFECTO DE LA PREADSORCION DIRECTA Y CRUZADA DE LOS ANTISUEROS DE LEU-E, BE, MET-E Y DINORFINA (1-8) CON LOS PEPTIDOS SINTETICOS HOMOLOGOS SOBRE LA INTENSIDAD DE LA FLUORESENCIA.

Antisueros	Péptidos			
	Leu-e	BE	Met-e	DI
Anti-Leu-e	-	++++	+++	+++
Anti-BE	++++	-	++++	++++
Anti-Met-e	+++	++++	-	++++
Anti-DI	+++	++++	++++	-

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

Las estructuras en las que no se observó fluorescencia después de haber realizado la preadsorción del primer anticuerpo con su péptido sintético específico se consideraron

específicamente inmunorreactivas.

La observación se hizo en un microscopio Leitz, Labourlux 12 con lámpara de vapor de mercurio de 50 W. y un bloque de filtros I-2 que tiene un rango de excitación u.v. azul, un filtro excitador entre la banda 450 a 490 μm ., espejo divisor de rayos RKP (filtro de reflexión de ondas cortas) de 510 μm ., un filtro supresor LP (filtro de paso de ondas largas) 515 μm . y filtro de excitación IKP (filtro de alta eficiencia para interferencia de ondas cortas), filtro supresor F (combinación de filtros de gelatina).

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

RESULTADOS

Resultados de Leu-encefalina

Nuestros resultados mostraron una fuerte inmunorreactividad a Leu-e en células localizadas en el lóbulo anterior de la hipófisis (fig. 8). En la eminencia media se encontraron fibras IR a Leu-e (fig. 9), estas fibras estaban situadas a lo largo del mismo eje que la estructura y presentaban varicosidades. En el lóbulo nervioso encontramos baja densidad de fibras IR a Leu-e.

Las células en el lóbulo anterior eran columnares y su tamaños entre 32 a 40 μm . en su diámetro mayor, y de 6 a 10 μm . en el diámetro menor. Las células presentaban un polo hacia los espacios sinusoidales y su núcleo (20 X 4 μm .) se situaba en el polo opuesto. En ocasiones los dos polos de las células estaban en contacto con los espacios sinusoidales (fig. 10). La IR se encontró únicamente dentro del citoplasma, el núcleo no presentó IR. No se encontró IR a Leu-e en las células del lóbulo intermedio como se muestra en la fig. 8.

Resultados de Beta-endorfina

En contraste con la IR a Leu-e, todas las células del lóbulo intermedio fueron IR a Beta-endorfina (fig. 11). En el lóbulo anterior se encontraron algunas células IR a BE,

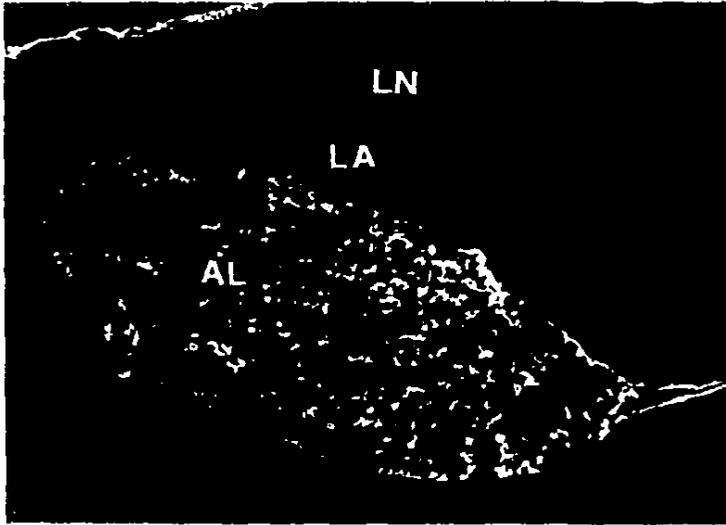


FIGURA 8. Fotomicrografía de un corte, de 10 μm de espesor, parasagital de la hipófisis del axolotl, procesado con la técnica indirecta de inmunofluorescencia para Leu-e, en la que se muestra la distribución de las células IR a Leu-e en el lóbulo anterior. Nótese la amplia distribución de la IR que corresponde a las zonas blancas. Amplificación 25 X.



FIGURA 9. Fotomicrografía con la misma técnica que la anterior donde se observa la IR a Leu-e en fibras de la eminencia media y en células del lóbulo anterior de la hipófisis. Amplificación 250 X.

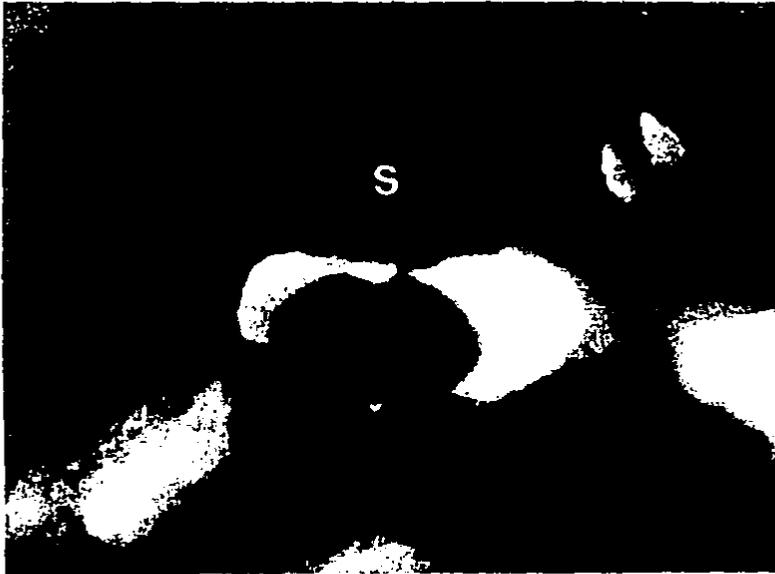


FIGURA 10. Características de las células del lóbulo anterior que son IR a Leu-e. En la fotomicrografía superior se puede observar que estas células están en estrecha relación con los sinusoides hipofisarios (S). Amplificación 250 X. En la fotomicrografía inferior se muestra una célula con el citoplasma fuertemente IR y el núcleo, en oscuro, no presenta inmunorreactividad. Nótese la forma columnar de la célula con una amplia exposición de su citoplasma hacia el espacio sinusoidal (S). Amplificación 1000 X.

principalmente en el pedículo hipofisiario (fig. 11 y 13) y otras esparcidas en el resto de la glándula. La morfología y el tamaño de las células IR a BE fueron similares a las descritas para las células IR a Leu-e (fig. 10). No hubo coexistencia entre las células con IR a Leu-e y a BE en las células del lóbulo anterior (fig. 13). No se encontraron fibras ni células IR en el lóbulo nervioso, ni en la eminencia media (fig. 11 y 14).



FIGURA 11. Distribución de la IR a BE en un corte parasagital de hipófisis de axolotl, de 10 μ m. de espesor. Nótese que todas las células del lóbulo intermedio son IR. Su citoplasma, fuertemente IR (en blanco), está orientado hacia los espacios sinusoidales y su núcleo hacia el lado opuesto (flechas). En el lóbulo anterior se encuentran algunas células IR localizadas principalmente en el pedículo (asterisco), no se observa IR en la eminencia media, ni en el lóbulo nervioso. Amplificación 25 X.

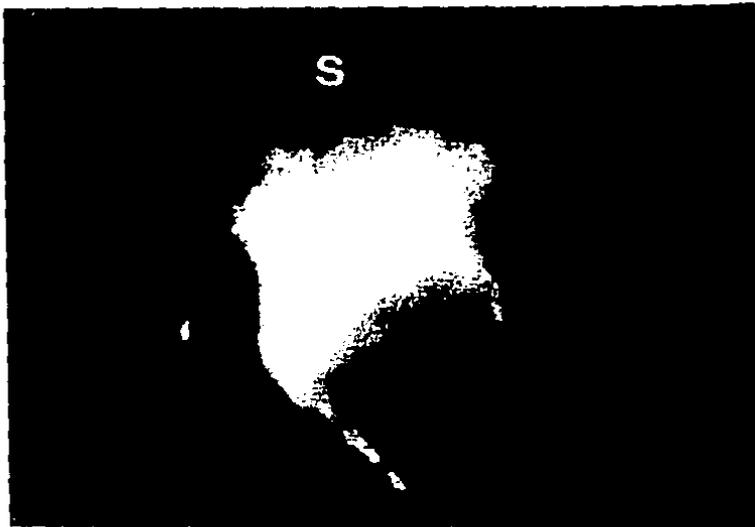


FIGURA 12. Características de las células del lóbulo anterior hipofisiario que son IR a BE. En la fotomicrografía superior se puede observar que algunas de las células IR forman el espacio sinusoidal (S). Amplificación 400 X. En la fotomicrografía inferior se muestra una célula de forma columnar, con su citoplasma fuertemente IR orientado hacia el sinusoides (S), y en el polo opuesto el núcleo que no presenta IR. Amplificación 1000 X.

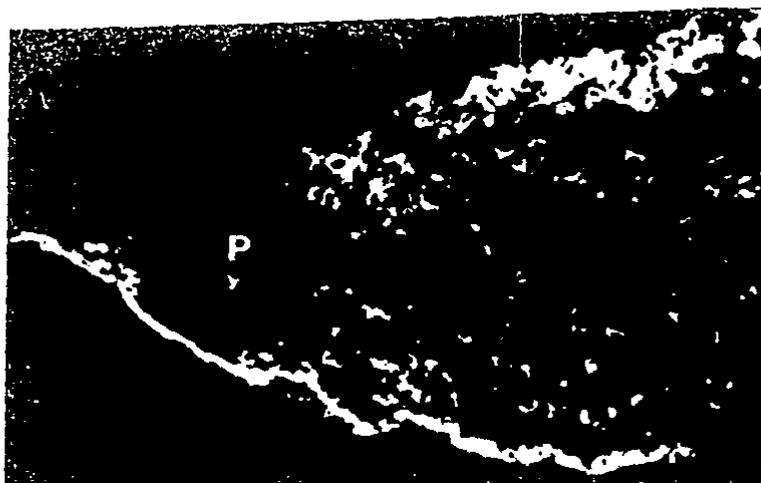


FIGURA 13. Fotomicrografías de cortes parasagitales seriados de la hipófisis del axolotl. En la fotomicrografía superior se muestra la distribución de las células IR a Leu-e; en la inferior, se muestran las células IR a BE que se localizan principalmente en el pedículo o pars tuberalis (P). En esta región no se observan células IR a Leu-e. Amplificación 100 X.

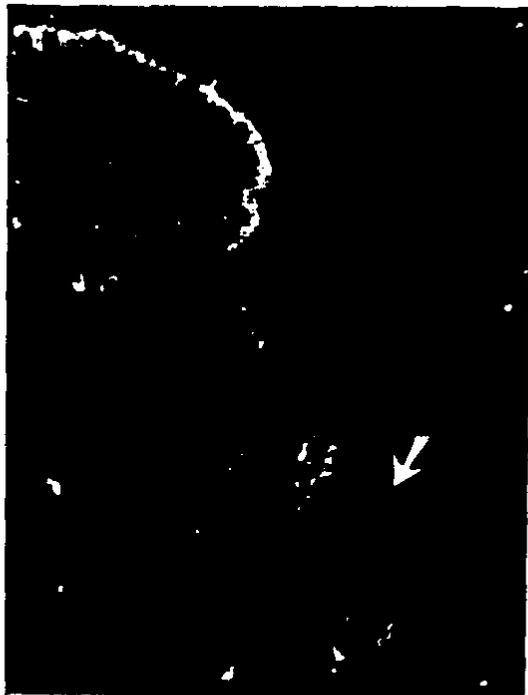


FIGURA 14. Fotomicrografía de un corte parasagital de hipófisis de axolotl, procesada para BE, en la que se muestra la eminencia media (flechas) sin IR; se observan células IR en el lóbulo intermedio y algunas en el pedículo del lóbulo anterior. Amplificación 250 X.

Resultados de la Met-encefalina

Las fibras IR a Met-e estaban localizadas en la eminencia media; se encontraron pocas fibras IR en el lóbulo nervioso (fig. 15). Estas fibras se localizaron a lo largo del mismo eje que la eminencia media y presentaron varicosidades. No se encontraron fibras ni células IR a Met-e en el lóbulo anterior y tampoco se encontraron en el lóbulo intermedio. Se encontraron neuronas y fibras IR a Met-e en el hipotálamo. En el lóbulo anterior se

encontró una fluorescencia baja, probablemente debida al cruzamiento del antisuero para Met-e con la Leu-e.

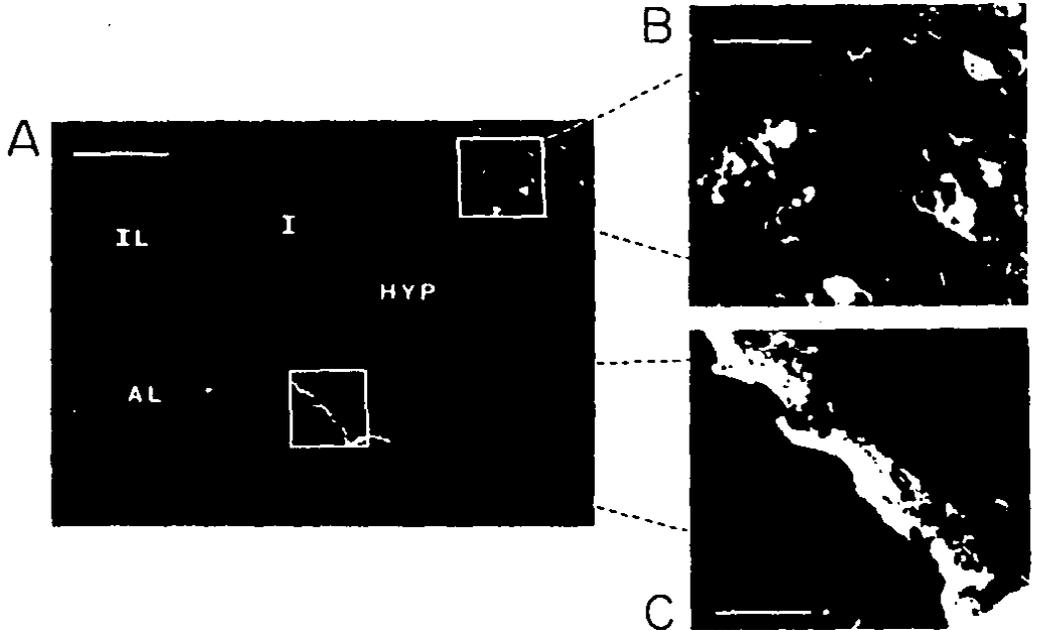


FIGURA 15. Fotomicrografías de un corte parasagital de hipófisis e hipotálamo de axolotl procesado para Met-e. En A se muestran el lóbulo anterior (AL) e intermedio (IL) sin IR, y en la eminencia media (recuadro inferior) se observan abundantes fibras IR. En el hipotálamo (HYP) se observan neuronas IR muy cercanas al infundíbulo (I). Barra de calibración 200 μm . B y C son ampliificaciones de los recuadros en A. Barra de calibración 50 μm .

Resultados de la Dinorfina

La distribución de la IR a Dinorfina (1-8) en la hipófisis es muy similar a la localización de la IR a Met-e. Se encontró abundante IR a Dinorfina en fibras del lóbulo nervioso y de la eminencia media (fig. 16). No se observó IR a dinorfina (1-8) en el lóbulo anterior ni en el intermedio.

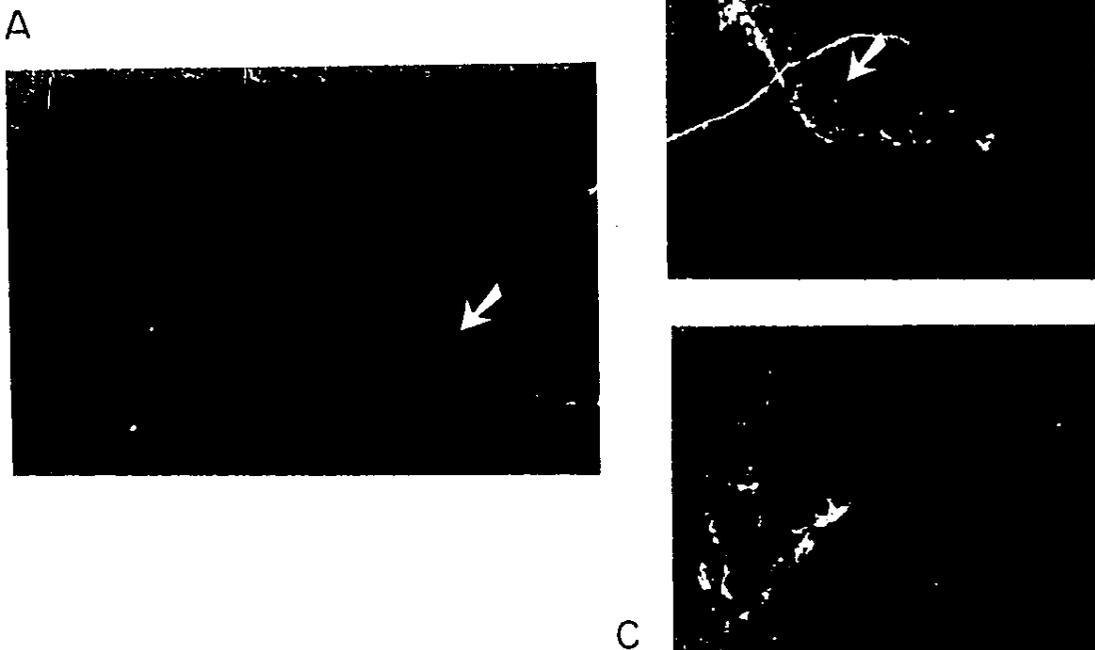


FIGURA 16. Fotomicrografías de cortes parasagitales de hipófisis de axolotl procesados para DI (1-8). En A no se aprecia IR en el lóbulo anterior ni en el intermedio; en la eminencia media se observan fibras IR. Amplificación 250 X. B Fotomicrografía en la que se muestra una amplificación de las fibras IR (flecha) en la eminencia media. Amplificación 400 X. En C se muestran abundantes fibras IR distribuidas en todo el lóbulo nervioso. Amplificación 250 X.

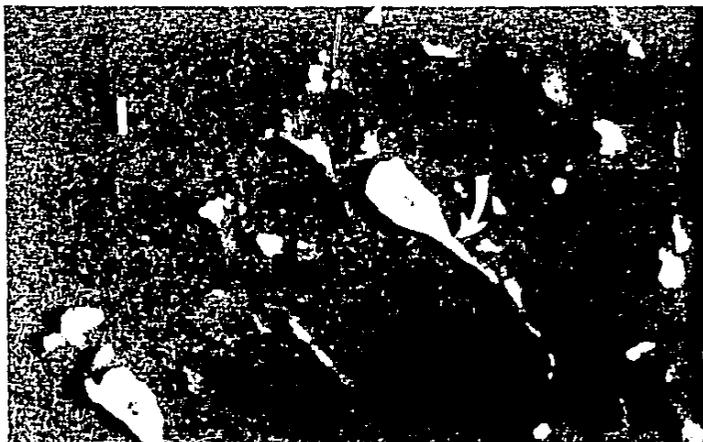
Resultados en hipotálamo

El objetivo de esta tesis no contempló la distribución de los péptidos opioides en el hipotálamo; sin embargo, ya que existe una relación estrecha, anatómica y funcional entre estas estructuras, describiremos algunos datos.

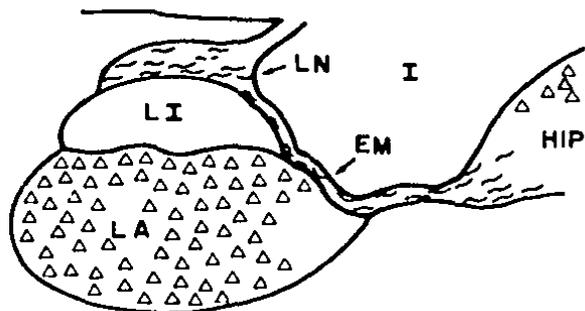
En los núcleos ventrales hipotalámicos encontramos IR para todos los antisueros estudiados en algunas neuronas subependimarias. Estas neuronas fueron bipolares o monopolares y en ocasiones se pudo ver una prolongación IR que iba hacia el infundíbulo y otra de sus prolongaciones hacia la parte ventral, también encontramos fibras IR abundantes sobre todo en la zona ventral (fig. 17).

FIGURA 17. Fotomicrograffias de cortes parasagitales de hipotálamo de axolotl. En A, se muestran varias neuronas con IR a Met-e que son subependimarias, monopolares con su prolongación neural hacia la parte ventral, opuesta al infundíbulo (ángulo superior izq.). En B se muestra una neurona bipolar con IR a DI en donde una de sus prolongaciones neurales (flecha) se dirige hacia el infundíbulo, (ángulo superior izq). En C, se observan neuronas IR a DI cuyas prolongaciones neurales se orientan en unas hacia el infundíbulo y en otras hacia la parte ventral. Nótese que dos de ellas presentan, al final de sus prolongaciones neurales, un ensanchamiento IR en el espacio infundibular (flechas). Amplificación 400 X.

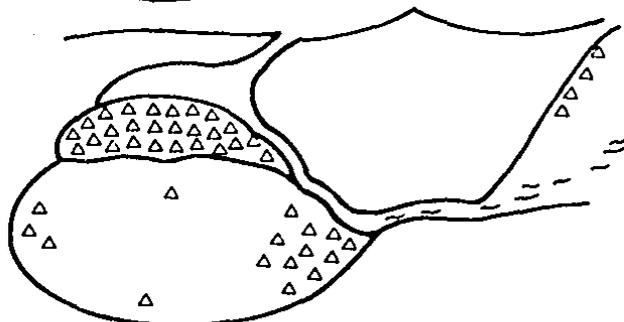
FIGURA 17



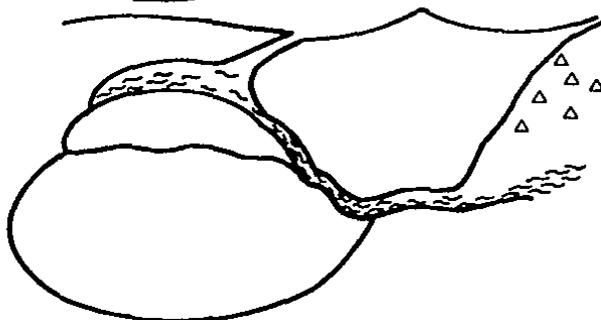
Leu-E



β -E



Met-E



Dinorfina

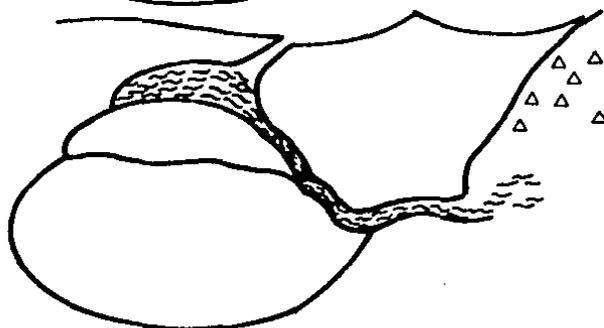


FIGURA 18. Esquema donde se muestra la distribución que tienen los péptidos opioides en la hipófisis del axolotl. Leu-E: Leucina-encefalina, β -E: Beta-endorfina, Met-E: Metionina-encefalina, LN: lóbulo nervioso, LI: lóbulo intermedio, LA: lóbulo anterior, I: infundíbulo, EM: Eminencia media, HIP: hipotálamo. Los triángulos representan células IR, las líneas onduladas representan fibras IR.

La tabla VI resume los resultados de la localización de la IR a los distintos péptidos opioides en la hipófisis e hipotálamo del axolotl.

TABLA VI

INMUNORREACTIVIDAD A LEU-E, BE, MET-E Y DI, EN LA HIPOFISIS E HIPOTALAMO DEL AXOLOTL.

	LN		LI		LA		HT		EM	
Antisuero	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C
Anti-Leu-e	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Anti-Met-e	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Anti-BE	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Anti-DI	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-

Notación: LN;lóbulo nervioso, LI;lóbulo intermedio, LA;lóbulo anterior, HT;hipotálamo, EM;eminencia media, F; fibras C; células, +; IR positiva, -; IR negativa.

Capítulo VI

DISCUSION

Nuestros resultados muestran la presencia de fibras IR a Leu-e en el lóbulo nervioso y en la eminencia media de la hipófisis del axolotl. Estos coinciden con los reportados en aves y en mamíferos (Bayón y col., 1980; Watson y col. 1977).

Las células IR a Leu-e que se encuentran en el lóbulo anterior descritas en esta tesis (fig. 8) no se han encontrado en vertebrados superiores. A este respecto, el único reporte es el de Dorés y col. (1984), en el que describen IR a encefalinas en células de la meta-adenohipófisis de la lamprea, que coincide con la IR a ACTH y alfa-MSH. Este hecho no es comparable con el del axolotl, ya que la meta-adenohipófisis de la lamprea corresponde al lóbulo intermedio de los vertebrados superiores. Estos autores mencionan que muy probablemente las encefalinas encontradas en este sitio sean el producto de la degradación de un precursor común de la ACTH y la MSH que es la proopiomelanocortina, que también contiene a la BE y ésta a su vez contiene la secuencia de la Met-e.

Nuestros resultados demuestran que la IR a Leu-e no es producto de la degradación de la proopiomelanocortina ya que la secuencia que codifica a la Leu-e no está contenida en la

secuencia de este precursor, además de que no encontramos IR a Met-e en el lóbulo anterior de la adenohipófisis del axolotl.

La IR a Leu-e no coexiste con la IR a BE en las células del lóbulo anterior (fig. 13). Este hecho descrito en el SNC de aves y mamíferos (Bloom y col., 1978; Bayón y col., 1980; Gramsch y col., 1979; Watson y col., 1978) demuestra que en los anfibios estos dos sistemas de péptidos opioides están separados, por el hecho de no venir de un precursor común y de no liberarse de las mismas células.

La Leu-e puede ser obtenida a partir de la proencefalina A, o por la prodinorfina o proencefalina B (Noda y col., 1982; Gluber y col., 1982; Comb y col., 1982; Kakidani y col., 1982). Nosotros pensamos que en esta especie la Leu-e encontrada en las células del lóbulo anterior proviene de la prodinorfina, por varias evidencias: a) No encontramos IR a Met-e, que también proviene de la proencefalina A, b) Martens y Herbert (1984) secuenciaron al gen que codifica la proencefalina A en la rana Xenopus laevis que es un anfibio (Urodelo), y encontraron que no existía la secuencia de la Leu-e y en su lugar contenía la secuencia de la Met-e, con un total de 7 secuencias de Met-e y ninguna de Leu-e. Este puede ser el caso del axolotl en donde la proencefalina A no contenga la secuencia de la Leu-e y ésta se genere exclusivamente a partir de la prodinorfina.

Otro hecho importante es que no encontramos IR a Dinorfina (1-8) en las células del lóbulo anterior (fig. 16). Esto

sugiere que la prodinorfina se degrada hasta sus componentes de bajo peso molecular, en contraste con lo reportado para ratas en donde los componentes de bajo peso molecular de la prodinorfina se encontraron en el lóbulo nervioso (Zeizinger y col., 1984). Coincidentemente en el lóbulo anterior de la rana no se encontró dinorfina (Cone y Goldstein, 1982). Asai y col. (1988), por medio de las técnicas, de cromatografía de filtración molecular aplicadas en el cerebro e hipófisis del axolotl, encontraron que en la generación de la Leu-e no participan intermediarios estables de alto peso molecular y ésta se encuentra generalmente en forma libre.

La distribución de la IR a BE en la hipófisis del axolotl sigue el mismo patrón que para las aves y mamíferos. Es decir, no existe IR a BE en el lóbulo nervioso, ni en la eminencia media (fig. 11 y 14), (Bloom y col. 1980). La BE coexiste con la ACTH, BLPH y MSH ya que todas las células del lóbulo intermedio son IR a BE, y dichas células contienen a estas hormonas en los anfibios (Pezalla y col., 1978), y son péptidos que tienen un precursor común.

La BE no coexiste con la IR a encefalinas (fig. 13), lo que apoya el hecho de que provienen de diferentes precursores como en aves y mamíferos (Bloom y col., 1978; Bayón y col., 1980; Gramsch y col., 1979; Watson y col., 1978).

La distribución de la IR a BE en el pedículo del lóbulo anterior coincide con la distribución de las células

corticotropas. Los efectos de la BE sobre las respuestas hormonales han sido difíciles de evaluar; algunos de los efectos más claros se han obtenido de los estudios realizados con las hormonas del lóbulo anterior como la hormona del crecimiento y la prolactina. Muchas investigaciones a este respecto muestran que la BE es muy eficiente como liberador de ambas hormonas a nivel hipotalámico (Holaday y Loh., 1981). El hecho de que la BE esté localizada en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis del axolotl sugiere que tiene un papel hormonal.

Con respecto a la Met-e la IR se encontró únicamente en fibras de la eminencia media y en muy pocas fibras del lóbulo nervioso (fig. 15), tal como se ha reportado para aves y mamíferos (Bayón y col., 1978; Watson y col., 1978). Existe una muy baja fluorescencia inespecífica en el lóbulo anterior ya que el antisuero tiene un porcentaje de cruzamiento del .6% con Leu-e, de ninguna manera significa que este antisuero tenga menos afinidad ya que en las mismas rebanadas de tejido existen células y fibras fuertemente IR en el hipotálamo (fig. 15).

La IR a Dinorfina (1-8) tiene una distribución parecida a la de la Met-e; sin embargo, las fibras del lóbulo nervioso son mucho más abundantes (fig. 16), como se ha reportado para otras especies (Cone y Goldstein 1982; Goldstein y Ghazorossian, 1980). En este sentido nuestros hallazgos difieren en que nosotros no encontramos dinorfina en el lóbulo intermedio, pudiendo ser esto un factor característico de esta especie. Existen resultados contradictorios con respecto a la existencia de IR a dinorfina en

el lóbulo anterior. Schwenk y col.(1989) encontraron altas concentraciones en la rata. Sin embargo, Goldstein y col. (1980) encontraron pequeñas cantidades de dinorfina en este animal; y en el anuro Bufo marinus prácticamente no existe, lo que concuerda con nuestros resultados. Seizinger (1984), en un estudio ontogenético en la rata, reporta que las concentraciones de los péptidos derivados de la prodinorfina en el lóbulo anterior e intermedio son muy bajas en los animales recién nacidos en comparación con los adultos; por lo que nosotros sugerimos que la ausencia de dinorfina en estos lóbulos hipofisiarios pueda deberse al desarrollo de un factor característico que aparece durante su ontogenia, ya que el axolotl se mantiene en una etapa larvaria, por lo que la distribución de dinorfina en la hipófisis correspondería a la de un animal recién nacido.

En el hipotálamo encontramos IR en neuronas y fibras para todos los péptidos opioides estudiados, y las neuronas IR se encontraron muy cerca del infundíbulo (fig. 17). En ocasiones se observaron sus prolongaciones IR entre las células ependimarias; otras de estas neuronas enviaban sus prolongaciones hacia la porción ventral de su SNC y hacia la eminencia media. La existencia de fibras IR a dinorfina, Met-e y Leu-e que se originan en el hipotálamo y además su presencia en la eminencia media y en el lóbulo neural sugiere que estos péptidos tienen una función reguladora sobre las hormonas hipofisiarias como se ha visto en otras especies (Rossier y col., 1979).

La presencia de IR a Leu-e en células del lóbulo anterior en contacto con los sinusoides (fig. 10) sugiere interesantes preguntas y posibilidades: ¿La Leu-e puede ser secretada como hormona a la circulación sanguínea del axolotl? ¿Qué factores liberadores controlan la secreción de estas células? ; ¿Con qué otras hormonas coexiste o es cosecretada? ; ¿Cuáles son sus órganos blanco fisiológicos? ;¿Y por ende cuáles son sus funciones?

La demostración de la existencia de péptidos opioides en el axolotl, anfibio que permanece en estado larvario alcanzando su madurez sexual en este estado (neotenia) y que es susceptible de sufrir metamorfosis, hace que los presentes hallazgos sean relevantes no sólo para el estudio de la filogenia de los péptidos opioides, sino también para la neuroendocrinología y la biología del desarrollo.

CONCLUSIONES

1. La presencia de IR a Leu-e en las células del lóbulo anterior no ha sido reportada en otras especies animales.
2. La distribución anatómica en la hipófisis del axolotl de la IR a BE es igual a la reportada para aves y mamíferos.
3. La IR a Leu-e y a BE no coexiste en las células del lóbulo anterior de la hipófisis del axolotl.
4. La presencia y localización topográfica celular de IR a Leu-e y BE en el lóbulo anterior sugiere que estos péptidos tengan un papel hormonal.
5. La ausencia de Met-e en las células del lóbulo anterior y junto el conocimiento de que la proencefalina A de los anfibios no tiene el gen que codifica la secuencia de la Leu-e (Martens y Herbert, 1984) sugieren que la Leu-e presente en las células del lóbulo anterior del axolotl proviene de la prodinorfina.
6. De hecho, el que el axolotl sea un animal inmaduro que no ha sufrido metamorfosis hace que estos hallazgos sean relevantes no sólo para este estudio, sino también para la neuroendocrinología y la biología del desarrollo.
7. Estos reportes, y las características biológicas del axolotl, hacen de él un excelente modelo para el estudio de los péptidos opioides.

Los resultados obtenidos en esta tesis servirán como modelo experimental para futuros estudios de los cambios que se presentan en los péptidos opioides durante el período de la metamorfosis y después de ella en el axolotl y en otros anfibios. Con lo que se podrán establecer parámetros comparativos entre la fase larvaria y la fase adulta.

BIBLIOGRAFIA

Akil H, Watson S J, Young E, Lewis M E, Khachaturian H, Walker M: Endogenous opioids: Biology and function. *Ann. Rev. Neurosci.*, 7: 223-255, 1984.

Akil H, Mayer D, Liebeskind J: Antagonism of stimulation produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*, 191: 961-962, 1976.

Allolio B, Winkelman W, Hipp F X, Kavlen D, Mies R: Effect of a met-enkephalin analog on adrenocorticotropin (ACTH), growth hormone, and prolactin in patients with ACTH hypersecretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55: 1-7, 1982.

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.

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, 1980.

Bayón A, Rossier J, Mauss A, Bloom F E, Iversen L, Ling N, Guillemin R: In vitro release (5-methionine) enkephalin and (5-leucine) enkephalin from the rat globus pallidus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 7: 3503-3506, 1978.

Bayón A, Koda L, Battenberg E, Bloom F E: Redistribution of endorphin and enkephalin immunoreactivity in the rat brain and pituitary after in vivo treatment with colchicine or cytochalasin B. *Brain Res.*, 183: 103-111, 1980.

Bayón A, Shoemaker W J, Bloom F E, Mauss A, Guillemin R: Perinatal development of the endorphin- and enkephalin-containing systems in the rat Brain. *Brain Res.*, 179: 93-101, 1979.

Bentley A M, Wallis M: Effects of two enkephalin analogues, morphine sulphate, dopamine and naloxone on prolactin secretion from rat anterior pituitary glands in vitro. *J. Endocr.*, 109: 313-320, 1986.

Blankstein J, Reyes F I, Winter J S D, Faiman C: Endorphins and the regulation of the human menstrual cycle. *Clin. Endocrinol.* 14: 287-294, 1981.

Bloom F, Battenberg E, Rossier J, Ling J L, Leppaluoto J, Vargo T M, Guillemin R: Endorphins are located in the intermediate and anterior lobes of the pituitary gland, not in the neurohypophysis. *Life Sci.*, 20: 43-48, 1977.

Bloom F E, Battenberg E, Rossier J, Ling N, Guillemin R: Neurons containing B-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: Immunocytochemical studies. *Proc.*

Natl. Acad. Sci., 75: 1591-1595, 1978. :

Bloom F E, Battenburg E, Rossier J et. al.:¹ Endorphins are located in the intermediate and anterior lobes of the pituitary gland, not in the neurohypophysis. Life Sci.,¹ 20: 43-8, 1977.

Bonnet K A, Grotin J, Gioamnin T, Cortes M, Simon E J: Opiate receptor heterogeneity in human brain regions. Brain Res., 221: 437-440, 1981.

Bradbury A F, Feldberg W F, Smyth D G, Snell C: Lipotropin C fragment an endogenous peptide with potent analgesic activity. En: Kosterlitz, H. W (Ed). Opiates and endogenous opioid peptides. Elsevier, Amsterdam, 9- 17, 1976.

Brauth S: Enkephalin-like Immunoreactivity within the telencephalon of the reptile caiman crocodilus. Neuroscience, 11 (2): 345-358, 1984.

Bruni J F, Vanvust D, Marshall S, Meites J: Effects of naloxone, morphine and methionine-enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone. Life Sci., 21: 461-466, 1977.

Buatti M, Pastermak G: Multiple opiate receptors: phylogenetic differences. Brain Res., 1218: 400-405, 1981.

Buckingham J C, Cooper T A: Differences in hypothalamo-pituitary adrenocortical activity in the rat after acute and prolonged treatment with morphine. Neuroendocrinology, 38: 411-417, 1984.

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.

Chang K J, Cuatrecasas P: Multiple opiate receptors. J. Biol. Chem., 254: 2610-2618, 1979.

Chang W L, Gainer H, Russell J, Loh Y: Proopiomelanocortin-converting enzyme activity in bovine neurosecretory granules. Endocrinology, 111: 1607-1614, 1982.

Chavkin C, Shoemaker W J, McGinty J F, Bayón A, Bloom F E: Characterization of the Prodynorphin and Proenkephalin Neuropeptide Systems in Rat Hippocampus. The Journal of Neuroscience 5: 808-816, 1985.

Chihara K, Arimura., Coy D H, Schally A V: Studies on the interaction of endorphins, substance P and endogenous somatostatin in growth hormone and prolactin release in rats. Endocrinology, 102: 281-290, 1978.

Colt E W D, Wardlaw S L, Frantz A G: The effect of running on plasma B- endorphin. Life Sci., 28: 1637-1640, 1981.

Comb M, 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.

Cone C, Goldstein A: A dynorphin-like opioid in the central nervous system of an amphibian. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3345-3349, 1983.

Copolov D L: Opioid biology: The next set of questions. *Aust Nz J. Med.*, 15: 98-106, 1985.

Cox B.M., Opheim K.E., Teschemacher H, Goldstein A: . *Life Sci.*, 16: 1777-1782, 1975.

Deviche P, Moore F L: Biochemical characterization and aurodele distribution of 3H-naloxone binding sites in a urodele amphibian. *Soc. Neurosci. Abs.*, 392.4: 981, 1989.

Dores R, 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.

Dores R M, Rothenberg M E: Isolation of Immunoreactive B-Endorphin- Related Peptides From the Posterior Pituitary of the Amphibian, Xenopus Laevis . *Peptides*, 8: 1119-1125, 1987.

Ellingboe J, Veldhuis J D, Mendelson J H, Kuenle J C, Mello N K: Effect of endogenous opioid blockade on the amplitude and frequency of pulsatile hormone secretion in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54: 854-857, 1982.

Fischli W, Goldstein A, Hunkapiller M, Hood L: Isolation and aminoacid sequence analysis of a 4,000 dalton dynorphin from porcine pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 5435-5437, 1982.

Fratta W, Yang H Y T, Majane B, Costa E: Distribution of B-endorphin and related peptides in the hypothalamus and pituitary. 4: 1903-1908, 1979.

Freye E, Hartung E, Sank G K: Perfusion of the fourth cerebral ventricle with synthetic opioid peptide, FK 33-824, induces dose related bradycardia and naloxone-reversible respiratory depression in the awake dog. *Pharmacology*, 25: 6-11, 1982.

Fricker L, Snyder: Purification and characterization of enkephalin-convertase an enkephalin-synthesizing carboxipeptidase. *J. Biol. Chem.*, 258: 10950-10955, 1983.

Gaiden E C, Littlefield D C, Putoff O C, Seivert A L: Menstrual abnormalities associated with heroin addiction. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 90: 155-159, 1964.

Gaillard R C, Grossman A, Smith R, Rees L H, Besser G M: The effects of a met-enkephalin in patients with adrenocortical disease. *Clin. Endocrinol.*, 14: 471-478, 1981.

Goldstein A, Ghazarossian V E: Immunoreactive dynorphin in pituitary and brain. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 6207-6210, 1980.

Goldstein A, Lowney I, Palk : Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener, levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 1742-1747, 1971.

Graf L, Kenessey A, Patty A, Grynbaum A, Marks N, Lajtha A: Cathepsin D. Generates gamma endorphin from beta-endorphin. Arch. Biochem. Biophys., 193: 101-109, 1979.

Gramsch C, Hollt V, Mehraein P, Pasi A, Herz A: Regional distribution of methionine-enkephalin and beta-endorphin-like immunoreactivity in human brain and pituitary. Brain Res., 171: 261-270, 1979.

Grossman A, Besser G M, Milles J J, Bayliss P H: Inhibition of vasopressin release in man by an opiate peptide. Lancet, 2: 1108-1110, 1980.

Gubler U, Seeburg P, Hoffman B J, Gage L P, Undefriend S: Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. Nature, 295: 206-208, 1982

Guillemin R, Ling N, Burgus 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.

Gustafsson M K S, Lohtonen M A E, Sundler F: Immunocytochemical evidence for the presence of :mammalian: neurohormonal peptides in neurones of the tape worm *Diphyllobothrium dendriticum*. Cell Tissue Res., 243: 41-49, 1986.

Herrick J C: The brain of the tiger salamander. *Ambystoma tigrinum* . The university of Chicago and London, Press: 1948.

Holaday J W, Loh H H: Neurobiology of beta-endorphin and related peptides. En: Li CH (Ed). Hormonal Proteins and Peptides. Academic Press, New York, 202-291, 1981.

HooK V Y H, Liston D: Distribution of enkephalin containing peptides within bovine chromaffin granules. Neuropeptides, 9: 263-267, 1987.

Hughes J: Isolation os 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 form the brain with potent opiate agonist activity. Nature, 255: 577-579, 1975.

Iadarola M J, Shin C, McNamara J O, Yang H Y T: Changes in dynorphin, enkephalin and cholecystokinin content of hippocampus and substantia nigra after amygdala Kindling. *Brain Res.*, 365: 185-191, 1986.

Iversen L, Iversen S, Bloom F, Vargo T, Guillemin R: Release of enkephalin from rat globus pallidus in vitro. *Nature*, 271: 679-687, 1978.

Iversen L L, Iversen S D, Blook F E: Opiate receptors influence vasopressin release from nerve terminals in rat neurohypophysis. *Nature*, 284: 350-351, 1980.

Josefsson J O, Johansson P: Naloxone-reversible effects of opioids on pinocytosis in *Amoeba proteus*. *Nature*, 282: 78-80, 1979.

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.

Kalra S P, Kalra P S: Opioid-adrenergic-steroid connection in regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinol.*, 38: 418-426, 1984.

Kavaliers M, Hirst M: Naloxone-reversible stress-induced feeding and analgesia in the slug *Limax maximus*. *Life Sci.*, 38: 203-209, 1986.

Kavaliers M, Hirst M, Teskey G C: Opioid systems and feeding in the slug. *Limax maximus* similarities to and implications for mammalian feeding. *Brain Res. Bull.*, 14: 681-685, 1985.

Khachaturian H, Lewis E, Schafer K H, Watson S: Anatomy of the CNS opioid systems. *Trends Nerv. Sys.*, : 111-118, 1985.

Khachaturian H, Watson S J, Lewis M E, Coy D, Goldstein A: Dynorphin immunocytochemistry in the rat central nervous system. *Peptides*, 3: 941-954, 1982.

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.

Kilpatrick D, Wahlstrom A, Lahm H M, Blacher R, Udenfriend S: Rimorphin, a unique, naturally occurring (Leu) enkephalin-containing peptide found in association with morphin and alpha-neo-dinorphin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 6480-6483-, 1982.

Kosterlitz H: Possible physiological significance of multiple endogenous opioid agonist. En: R F Ber, E G Basset (Eds). *Mechanisms of pain and analgesic compound*. Raven Press, N. Y., 207-214, 1979.

- Leander J P: A kappa opioid effect increased urination in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244: 89-94, 1983.
- Leboulenger F, Charnay Y, Dubois P, Rossier J, Vandry H: Presence of proenkephalin in chromaffin cells of the frog adrenal gland. *Neurochem. Int.*, 6: 773-777, 1984.
- Lee N M, Smith A P: A protein-lipid model of the opioid receptor. *Life Sci.*, 26: 1459-64, 1980.
- 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.
- Leroith D, Liotta A, Roch J, Shiloach J, Lewis M, Pert C, Kreiger D: Corticotropin and B-endorphin like materials are native to unicellular organisms. *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.* 81: 955- 958, 1984.
- Lewis M E, Khachaturian H, Watson S J: Visualization of opiate receptors and opioid peptides in sequential brain sections. *Life Sci.*, 31: 1247-1250, 1982.
- Lightman S L, Ninkovic M, Hunt S P, Iversen L: Evidence for opiate receptors on pituicytes. *Nature*, 305: 235-237, 1983.
- Lord J A H, Waterfield A A, Hughes J, Kosterlitz H: Endogenous opioid peptides multiple agonists and receptors. *Nature*, 267: 495-499, 1977.
- 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.
- Martens G, Herbert E: Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. *Nature*, 310: 251-254, 1984.
- Martin R, Voigt K H: Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin nerve terminals of rat neurohypophysis. *Nature*, 289: 502-504, 1981.
- Martin W E, Eades C B, Thompson J A, Hupper R E, Gibert P E: The effects of morphine and nalorphine like drugs in the non-dependent and morphine dependent chronic spinal dog. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 197: 517-532, 1976.
- Martin W R: . *Pharmacol. Rev.*, 19: 463-522, 1967.
- Martin W R: Pharmacology of opioids. *Pharmacol. Rev.*, 35: 285-323, 1983.

- Mayer D, Liebeskin J: Pain reduction by local electrical stimulation of the brain. An anatomical and behavioural analysis. *Brain Res.*, 68: 73-93, 1974.
- Mendelsohn G, D'Agostino R, Eggleston J C, Baylin S B: Distribution of B-endorphin immunoreactivity in normal human pituitary. *J. Clin. Invest.*, 63: 1297-1301, 1979.
- Minamino N, Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H, Igaraki M: A new opioid octapeptide related to dynorphin from porcine hypothalamus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 95: 1475-1481, 1980.
- Mizuno K, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H: A new family of "big" Met-enkephalins from bovine adrenal medulla purification and structure of docosa (BAM-zzp) and eicosapeptide (BAM-zop) with very potent opiate activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 97: 1283-1290, 1980.
- 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.
- Ninkovic M, Hunt S P, Emson P, Iversen L L: The distribution of multiple opiate receptors in bovine brain. *Brain Res.*, 214: 163-167, 1981.
- 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 1987. *Peptides*, 10: 205-236, 1989.
- Osborne H, Hollt U, Herz A: Potassium induced release of enkephalins from rat striatal slices. *Eur. J. Pharmacol.*, 48: 219-221, 1978.
- Ovigley M E, Yen S S: The role of endogenous opiates in CH secretion during the menstrual cycle. *Int. J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51: 179-181, 1980.
- Pasternak G W: High and low affinity opioid binding sites relationship to mu and delta. *Life Sci.*, 31: 1303-6, 1982.
- Paterson S J, Robson L E, Kosterlitz H W: Classification of opioid receptors. *Br. Med. Bull.*, 39: 31-6, 1983.
- Pert C, Aposhian D, Snyder S: Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. *Brain Res.*, 75: 356-561, 1974.
- Pert C, Snyder S: Opiate receptor Demonstration in nervous tissue. *Science*, 179: 1011-1014, 1973.

Pert K A, Kuhar M J, Snyder S H: Autoradiographic localization of the opiate receptor in the opiate receptor in the rat brain. *Life Sci.*, 16: 1849-1854, 1975.

Pestarino M: Occurrence of Beta-endorphine like immunoreactive cells in the neural complex of a protochordate. *Cell. Mol. Biol.* 31: 27-31, 1975.

Pezalla P D, Seidah N G, Benjannet S, Crine P, Lis M, Chretien M: Biosynthesis of Beta-endorphin, Beta-lipotrophin and putative ACTH-LPH precursor in the frog pars intermedia. *Life Sci.*, 23: 2281-2292, 1978.

Rivier C, Vale W, Ling N, Brown M, Guillemin R: Stimulation in vivo of the secretion of prolactin and growth hormone by B-endorphin. *Endocrinology* 100: 238-241, 1977.

Robert J F, Ovigley M E, Yen S S C: Endogenous opiates modulate pulsatile luteinizing hormone release in humans. *J Clin Endocrinol. Metab.*, 52: 583-585, 1981.

Rossier J, Battenberg E, Pittman Q, Bayón A, Koda L, Miller R, Gillemín R, Bloom F: Hypothalamic enkephalin neurones may regulate the neurohypophysis. *Nature*, 227: 653-655, 1979.

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.

Ruda M A, Iadarola M J, Cohen L V, Young III W S: In situ hybridization histochemistry and immunocytochemistry reveal an increase in spinal dynorphin biosynthesis in a rat model of peripheral inflammation and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 622-626, 1988.

Ruegg U, Cuenod S, Hiller J, Cioannini T, Howells R, Simon J: Characterization and partial purification of solubilized active opiate receptor from toad brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 4635-4638, 1981.

Santoro C, Hall L M, Zukin R S: Opioid receptor subtypes in *Drosophila melanogaster*. *Soc. Neurosci. Abs.*, 11: 307, 1985.

Schwenk M, Jackisch R, Knepel W: Subcellular distribution of dynorphin-like immunoreactivity in rat adenohypophysis in comparison with luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Life Sci.*, 41: 2403-2409, 1987.

Seinzinger B R, Liebisch D C, Grimm C, Herz A: Ontogenic development of the pro-enkephalin B (= Prodynorphin) opioid peptide system in the rat pituitary. *Neuroendocrinology*, 39: 414-422, 1984.

Seinzinger R B, Holtt V, Herz A: Proenkephalin b (prodynorphin)-derived opioid peptides evidence for a

differential Processing in lobes of the Pituitary. *Endocrinology*, 115: 662-671, 1984.

Simantov R, Goodman R, Aposhian D, Snyder S H: Phylogenetic distribution of morphin-like peptide "enkephalin". *Brain Res.*, 111: 204- 211, 1976.

Simon J, Benythe S, Borsodi A, Szucs M, Wollemann M: Separation of K- opioid receptor subtype from frog brain. *FEBS.*, 183: 395-397, 1985.

Simon J, Szucz M, Benythe S, Borsodia A, Zeman P, Wolleman M: Solubization and characterization of opioid binding sites from frog Rana esculenta . *Brain J. Neurochem.*, 43: 957-963, 1984.

Slizgi G R, Ludens J H: Studies on the nature and mechanism of the diuretic activity of the opioid analgesic ethylketocyclazocine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 220: 585-91, 1982.

Smith M, Smith B: Analysis of the literature on the mexican axolotl. Synopsis of the herpetofauna of Mexico. Eric Lundberg, Augusta West Virgini, 1971.

Stefano G B, Kream R M, Zukin R S: Demonstration of stereo specific opiate binding in the nervous tissue of the marine molluse *Mytilus edulis*. *Brain Res.*, 181: 440-445, 1980.

Stefano G B, Scharrer B, Assanah P: Demonstration, characterization and localization of opioid binding sites in the midgut of the insect *Leucophaea maderal* (Blattaria). *Brain Res.*, 25: 205-212, 1982.

Steiner, Docherty K, Carol R: Colgi'granule processing of peptide hormone and neuropeptide precursors. *J. Cell. Biochem.*, 24: 121-130, 1984.

Steiner, Quinn S, Chan J, Marsh J, Tager: Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1-16, 1980.

Takahashi A, Kawauchi H, Mouri T, Sasaki A: Chemical and Immunological characterization of salmon endorphins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 53: 381-388, 1984.

Terenius L: . *Acta Pharmacol Toxicol* 32: 317-320, 1973.

Teschemacher H, Opheim K.E., Cox B.M., Goldstein A: . *Life Sci.*, 16: 1771-1776, 1975.

Vaudry H, Jenks B, Oberbeeke U: Biosynthesis processing and release of pro-opiome-lanocortin relate peptides in the intermediate lobe of the pituitary gland of the frog Rana ridibunda . *Peptides*, 5: 905-912, 1984.

- Vindrola O, Briones R, Asai M, Fernández A: Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in rat brain. *Neurosci. Lett.*, 21: 39-43, 1981.
- Watson S J, Akil H: Alpha-MSH in rat brain occurrence within and outside brain beta-endorphin neurons. *Brain Res.*, 182: 217-223, 1980.
- Watson S J, Akil H, Ghazorossian V E, Goldstein A: Dynorphin immunocytochemical localization in brain and peripheral nervous system preliminary studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 1260-1263, 1981.
- Watson S J, Akil H, Richard III C W, Barchas J: Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature*, 275: 226-228, 1978.
- Watson S J, Akil H, Sullivan S O, Barchas J D: Immunocytochemical localization of methionine-enkephalin Preliminary observations. *Life Sci.*, 25: 733-738, 1977.
- Watson S J, Khachaturian H, Taylor L, Fischli W, Goldstein A, Akil H: Pro-dynorphin peptides are found in the same neurons throughout rat brain: Immunocytochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80: 891-894, 1983.
- Weber E, Roth K A, Barchas J D: Colocalization of L-neoendorphin and dynorphin immunoreactivity in hypothalamic neurons. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 103: 951-958, 1981.
- Weichert C, Presch W: Elementos de anatomía de los cordados. Mc. Graw. Hill., 1981.
- Yang H y t, Hexum T, Costa E: Opioids in adrenal gland. *Life. Sci.*, 27: 1119-1125, 1980.
- Zakarian S, Smyth D G: Distribution of B-endorphin related peptides in rat pituitary and brain. *Biochem. J.*, 202: 261-271, 1982.
- Zamir N: On the origin of Leu-enkephalin and Met-enkephalin in the rat neurohypophysis. *Endocrinology*, 117: 1687-1692, 1985.
- Zamir N, Palkovits M, Weber E, Mezey E, Brownstein M J: A dynorphinergic pathway of Lu-enkephalin production in rat substantia nigra. *Nature*, 307: 643-645, 1984.
- Zipser B, Ruff M R, Higgins W, Pert C B: Comparison of cross linked opiate receptors from rat, leech and tetrahymena. *Soc. Neurosci. Abs.*, 11: 308, 1985.