

11281

6
2007

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina
Coordinación de Estudios de Posgrado

**Estudio Ontogenético de los Péptidos Opioides en la Hipófisis del Axolotl
*Ambystoma Mexicanum***

t e s i s

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Biomédicas
(Morfología)

p r e s e n t a

M. en C. Martha María de la Salud León Olea

Tutor: Dr. Francisco Pellicer Graham

México, D. F.
1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Histología de la División de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Mexicano de Psiquiatría, bajo la asesoría del Dr. Francisco Pellicer Graham, con el apoyo de los proyectos CONACyT 1183-N9203, 3290A y 3290 del IMP.

A Francisco, por todo.

Con mucho cariño para mis papás Gabriel y Martha.

A mis hijos Mariano, Verónica y Natalia por su cariño, apoyo y por el tiempo que les quité para llevar a cabo este trabajo.

A mis hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A Marcela Sánchez Álvarez por su amistad y gran ayuda en todos los aspectos del desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Silvia Cruz, al Dr. Miguel Condés Lara, al Dr. Enrique Soto, al Dr. Osvaldo Vindrola, a la Dra. María Rosa Padrós y al Dr. Enrique Pedernera por sus valiosos comentarios a esta tesis.

A Raúl Cardoso Gutiérrez por su amistad y por su ayuda en la preparación del material gráfico.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Esther Talavera, Eduardo Sánchez Islas, Feliciano Camacho, Pilar Chiappa, Ricardo Mondragón, Miguel Asai, Guadalupe Martínez L., Rosa María Sánchez M. y Sheila Mejía G., por su colaboración y amistad invaluable.

A las secretarias Juanita González M., Malena Orozco G. Vicky Vargas R. por su ayuda.

Agradezco al Dr. Ramón de la Fuente, Director del Instituto Mexicano de Psiquiatría y al Dr. Augusto Fernández Guardiola, Jefe de la División de Investigaciones en Neurociencias del IMP, por las facilidades prestadas para la realización de esta tesis.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION
Subdivisión de Maestrías y Doctorados

Of. No. 016/LBB/MEMK/III/96.

DR. ENRIQUE BAZUA RUEDA
Coordinador General de Estudios
de Posgrado, U.N.A.M.
Presente

At'n: Unidad de Registro e Información.

Informo a usted que el (la) C. MARTHA MARIA DE LA SALUD LEON OLEA
aspirante al grado de DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS (MORFOLOGIA)
con la tesis titulada "ESTUDIO ONTOGENETICO DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES EN LA
HIPOFISIS DEL AXOLOTL, AMBYSTOMA MEXICANUM"

será examinado (a) en el aula de exámenes de grado "Luis Castelazo Ayala" (Edificio de la
Unidad de Posgrado, primer piso, costado sur de la Torre II de Humanidades) por el jurado
constituído por los siguientes sinodales:

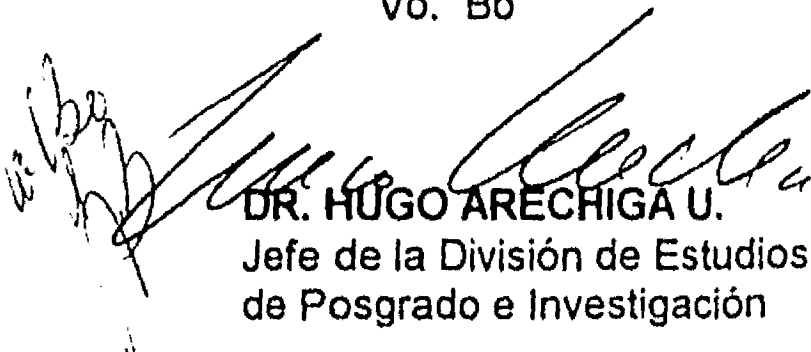
PRESIDENTE:	DR. MIGUEL CONDES LARA
SECRETARIO:	DRA. SILVIA L. CRUZ MARTIN DEL CAMPO
PRIMER VOCAL:	DR. FRANCISCO PELLICER GRAHAM
SEGUNDO VOCAL:	DR. OSVALDO VINDROLA ASTI
TERCER VOCAL:	DR. ENRIQUE SOTO EGUIVAR
SUPLENTE:	DRA. MARIA ROSA PADROS
SUPLENTE:	DR. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D. F., a 11 de marzo de 1996.

Vo. Bo


DR. HUGO ARECHIGA U.
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación

Vo. Bo.


DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
Director de la Facultad
de Medicina

INDICE GENERAL

Indice General.....	I
Indice de tablas y figuras.....	III
Lista de abreviaturas.....	IV
Resumen	1
Antecedentes.....	2
Precusores de los péptidos opioides.....	3
Biosíntesis de los péptidos opioides.....	4
Liberación de los péptidos opioides.....	8
Distribución de los precusores opioides y sus derivados.....	9
Receptores de los péptidos opioides.....	10
Receptores en la glándula hipófisis.....	14
Fisiología de los péptidos opioides.....	16
Los péptidos opioides en la escala filogenética.....	18
Péptidos opioides e anfibios.....	19
Distribución de los péptidos opioides en la glándula hipófisis.....	23
Los péptidos opioides y su relación con la neuroendocrinología.....	24
Características biológicas generales del axolotl <i>Ambystoma mexicanum</i>	27
Clasificación taxonómica.....	27
Glándula hipofisiaria.....	28
Metamorfosis.....	31
Aspectos endócrinos en relación con la metamorfosis.....	33
Aspectos endócrinos de la neotenia.....	34
Planteamiento del Problema.....	37
Objetivos y Metas.....	38
Material y Método.....	40
Experimento piloto de metamorfosis (#1).....	40
Experimento de metamorfosis para inmunohistoquímica (#2 y #3).....	43
Experimento de coexistencia (#4).....	44
Procedimiento Inmunohistoquímico.....	45
Corte y montaje.....	45
Método indirecto de inmunofluorescencia.....	46
Antisueros.....	47
Tinciones Histológicas.....	48
Experimento con antagonistas de los receptores opioides (#5).....	49

Análisis de los resultados.....	50
Resultados.....	51
Experimento 1, piloto.....	52
Experimento 2.....	62
Experimento 3.....	63
Experimento 5.....	65
Resultados de la inmunohistoquímica a péptidos opioides en las diferentes etapas de la metamorfosis.....	66
Etapa I.....	68
Etapa II.....	70
Etapa III.....	72
Etapa IV.....	73
Especificidad de los anticuerpos para los péptidos opioides.....	80
Resultados de los experimentos de coexistencia 4.....	80
Discusion.....	87
Bibliografía.....	101

Índice de Tablas y Figuras

Antecedentes	
Figura 1. Precursores de los péptidos opioides.....	5
Tabla I. Familia de los péptidos opioides.....	7
Tabla II. Características de los receptores clonados.....	15
Figura 2. Proencefalina bovina/proencefalina del <i>Xenopus</i>	20
Tabla III. Distribución de IR a encefalinas en el SNC del <i>A. mexicanum</i>	21
Figura 3. Fotomontaje del Cerebro del axolotl y esquema de la hipófisis.....	29
 Material y Métodos	
Figura 4. Sitios anatómicos y puntos de medición en el axolotl.....	42
Tabla IV. Inmunorreactividad cruzada de los anticuerpos por RIA.....	47
Tabla V. Diluciones de los anticuerpos utilizados.....	48
 Resultados	
Figura 5. Fotografías del <i>A. mexicanum</i> adulto neoténico y la salamandra.....	51
Tabla VI. Exp. #1, días de reabsorción de las estructuras anatómicas.....	53
Figura 6. Exp. #1, gráfica de aleta ventral = 0.....	54
Figura 7. Exp. #1, gráfica de aleta dorsal = 0.....	55
Figura 8. Exp. #1, gráfica de aletas y branquias = 0.....	56
Figura 9. Exp. #1, gráfica del % de las aletas ventrales.....	57
Figura 10. Exp. #1, gráfica del % de las aletas dorsales.....	58
Figura 11. Exp. #1, gráfica del % de las branquias.....	59
Figura 12. Exp. #1, gráfica del % del peso.....	60
Figura 13. Exp. #1, gráfica de los pesos iniciales y los pesos finales.....	61
Tabla VII. Etapas de la metamorfosis.....	62
Tabla VIII. Exp. #2, grupo <i>A. tigrinum</i> , días de reabsorción de las est. anatómicas.....	63
Tabla IX. Exp. #3, grupo I <i>A. mexicanum</i> , días de reabsorción de las est. anatómicas..	64
Figura 14. IR a MERGL.....	75
Figura 15. IR a LE.....	76
Figura 16. IR a ME.....	77
Figura 17. IR a LE y a ME en la salamandra.....	78
Figura 18. IR a dinorfinas.....	79
Tabla X. Preadсорción directa y cruzada de los anticuerpos por inmunohistoquímica.	80
Figura 19. IR a BE y ACTH.....	82
Figura 21. IR a LE, PRL y ACTH.....	83
Figura 22. IR a LHRH.....	84
Figura 20. Esquemas de hipófisis con la distribución de los diferentes péptidos durante la metamorfosis.....	85
 Discusión	
Tabla XI. Etapas de la metamorfosis en el <i>A. tigrinum</i>	87

Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormona adenocorticotropa, (por sus siglas en ingles).
AVP	Arginina vasopresina
BE	β -endorfina
BLPH	β -lipotropina (por sus siglas en ingles)
DIN 1-8	Dinorfina 1-8
DIN A	Dinorfina A (1-17)
DIN B	Dinorfina B (rimorfina)
EM	Eminencia media
Fig.	Figura
FSH	Hormona folículo estimulante, (por sus siglas en ingles).
GH	Hormona de crecimiento, (por sus siglas en ingles).
HIP	Hipotálamo
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión, (por sus siglas en ingles).
I	Infundíbulo
IR	Inmunorreactividad
LE	Leucina-encefalina
LHRH	Factor liberador de la hormona luteinizante, (por sus siglas en ingles).
LA	Lóbulo anterior de la hipófisis
LI	Lóbulo intermedio de la hipófisis
LN	Lóbulo neural de la hipófisi
ME	Metionina-encefalina
MERGL	Metionina-encefalina-Arg-Gli-Leu
OXI,	Oxitocina
PDNF	Prodinorfina
PEF	Proencefalina
PRL	Hormona prolactina
T3	Hormona triyodotironina
T4	Hormona tetrayodotironina
TRH	Factor liberador de la TSH, (por sus siglas en ingles).
TSH	Hormona estimulante de la tiroides, (por sus siglas en ingles).
POMC	Proopiomelanocortina
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RNA _m	Acido ribonucléico mensajero
RIA	Radio inmuno análisis
SNC	Sistema nervioso central

RESUMEN

El estudio de los péptidos opioides, ha tenido una gran relevancia ya que estos péptidos participan no sólo en los mecanismos de la información nociceptiva y neuromodulación, sino también están involucrados en procesos neurosecretores y hormonales relacionados con el metabolismo y el desarrollo. Es en este sentido que resulta de gran importancia estudiar la distribución de estos péptidos en organismos a los cuales se pueden manipular sus distintas etapas del desarrollo, como es el caso del *Ambystoma mexicanum*. En un trabajo previo describimos la distribución anatómica que tienen los péptidos opioides tales como Leu-encefalina (LE), Met-encefalina (ME), β -endorfina (BE) y Dinorfina 1-8 (DIN 1-8) en la hipófisis del *A. mexicanum* adulto neoténico. Uno de los hallazgos importantes fue la existencia de LE en células de la adenohipófisis, ya que no se había reportado en otras especies de animales.

El objetivo de esta tesis fué realizar, con la ayuda de técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, un estudio ontogénico de la distribución anatómica de los péptidos opioides tales como: LE, ME, MERGL (Metionina-encefalina Arg-Gli-Leu), BE, DIN 1-8, DIN A y DIN B en la hipófisis del *A. mexicanum* durante la metamorfosis inducida experimentalmente mediante la administración de tetrayodotironina (T4), así como en la salamandra (estado adulto). Se utilizaron *A. mexicanum* y *A. tigrinum* adultos neoténicos a los que se les indujo la metamorfosis con una dosis única de T4 intraperitoneal. Se obtuvieron animales en diferentes etapas de la metamorfosis hasta el estado adulto de salamandra, en los que se realizaron técnicas inmunohistoquímicas para detectar los diferentes péptidos opioides. Con los resultados obtenidos se estableció la distribución anatómica de los péptidos opioides en la hipófisis de los *Ambystomas mexicanum* y *tigrinum* en el estado de adulto neoténico y los cambios en su distribución en las diferentes etapas de la metamorfosis hasta el estado adulto o salamandra. La inmunorreactividad (IR) a encefalinas (LE y ME) en las células del lóbulo intermedio y el lóbulo anterior presentó variaciones que van desde la desaparición en la etapa I, un aumento importante de la IR en la etapa II, para desaparecer nuevamente en las etapas III y IV. La IR a los demás péptidos opioides estudiados no presentó cambios aparentes durante el proceso de metamorfosis. La existencia de IR a péptidos opioides en las células de los lóbulos intermedio y anterior de la hipófisis, así como, en fibras de la eminencia media y el lóbulo neural, y las variaciones de la IR a estos péptidos durante la metamorfosis sugiere una relación funcional moduladora, ya sea de forma parácrina o endócrina, con el proceso de maduración y desarrollo que implica la metamorfosis.

ABSTRACT

The study of opioid peptides is relevant since these substances not only participate in the mechanisms of nociception and neuromodulation, but also in neurosecretory and hormonal processes related to metabolism and development. In this sense, it is important to study the distribution of these peptides in organisms in which the manipulation of the different developing stages is possible. This is the case of the amphibian *Ambystoma mexicanum*. In a previous work, the description of the anatomical distribution of opioid peptides such as leu-enkephalin (LE), met-enkephalin (ME), β -endorphin (BE) and dynorphin 1-8 (DIN 1-8) was reported in the hypophysis on the adult neotenic *A. mexicanum*. The main finding of this study was the presence of LE in adenohypophysial cells, which had not been previously reported.

The aim of this thesis was to undertake an ontogenic study, using histological and immunochemical techniques, of the anatomical distribution of the following opioid peptides: LE, ME, MERGL (Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu), BE, DIN 1-8, DIN A and DIN B in hypophysis of *A. mexicanum*, during its experimentally induced metamorphosis, as well as in hypophysis of salamander (adult state). Metamorphosis was experimentally induced by a unique intraperitoneal injection in two adult neotenic axolotl species: *A. mexicanum* and *A. tigrinum*. Animals in different stages of metamorphosis were obtained and immunohistochemical techniques were carried out to localize different opioid peptides. With the results of these experiments, the anatomical distribution of opioid peptides in hypophysis of *A. mexicanum* and *A. tigrinum* was described in the neotenic adult stage, as well as the changes in their distribution in the different stages of metamorphosis. Immunoreactivity (IR) to enkephalins (LE and ME) in cells of intermediate and anterior hypophysial lobes presented changes that comprehend its absence in stage I, an important increase in its intensity in stage II, followed by its disappearance in stages III and IV. The other opioid peptides included in this study did not present significant changes during the process of metamorphosis. The existence of IR to opioid peptides in neurons of anterior and intermediate hypophysial lobes, as well as in fibers of median eminence and neural lobe, and the changes in IR intensity of these peptides during metamorphosis suggest a paracrine or endocrine modulatory physiological role of these substances during maturation and developmental processes involved in metamorphosis.

ANTECEDENTES

Desde épocas muy remotas, el hombre en su afán por eliminar o disminuir el dolor ha utilizado diferentes sustancias provenientes de plantas. Derosne en 1803 obtiene una sal de opio a la que por sus efectos clínicos de inducción de sueño llamó narcotina. Dos años más tarde Sertuner purificó la narcotina y a esta sustancia la denominó *morphium*, con la característica fundamental de ser un potente analgésico (Peset, 1973). Esto abrió uno de los capítulos de mayor importancia en la farmacología y la fisiopatología del dolor.

Fue hasta la década de los setenta cuando se aportaron evidencias del funcionamiento de los opioides mediante la identificación de los receptores estereoespecíficos a la morfina, con el uso de ligandos sintéticos como la naloxona tritiada. Estos trabajos se realizaron simultáneamente por Terenius (1973) en Suiza, y Pert y Snyder (1973) en Baltimore. El descubrimiento de los receptores a opiáceos en el íleon de cobayo y en el conducto deferente del ratón (Kosterlitz y Waterfield, 1975); la existencia de estos receptores en las membranas de células nerviosas en donde tienen efecto los opiáceos (Pert y Snyder, 1973; Pert y col., 1975; Terenius, 1973), la reverción de los efectos de la morfina por la administración de un antagonista, la naloxona (Akil y col., 1976), y la producción de analgesia por estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal en la rata (Mayer y Liebeskind, 1974), entre otras observaciones, hicieron pensar que había sustancias endógenas que mimetizaban las acciones de los derivados del opio. En 1975 Hughes, en experimentos realizados con homogenados de cerebro de cerdo, logró purificar una sustancia que reproducía los efectos de la morfina en las preparaciones biológicas del conducto deferente del ratón y el íleon del cobayo, produciendo la inhibición de las contracciones evocadas. Este efecto era revertido por la administración de naloxona. El mismo grupo (Hughes

y col., 1975), dió la secuencia de aminoácidos que conforman los oligopéptidos que llamaron encefalinas y que consisten en pentapéptidos: la Metionina-encefalina (ME) y a la Leucina-encefalina (LE), cuyas secuencias son:

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

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

En el mismo año, Goldstein y col., (1971) aislaron un péptido de la hipófisis de bovino y de porcino que tenía también los efectos de la morfina. En 1976, se identificó la estructura de este compuesto y fue llamado β -endorfina (BE), el cual corresponde al fragmento 61-91 de la β -Lipotropina (BLPH), (Bradbury y col., 1976). Guillemin y col. (1976) determinaron la estructura de la α y γ endorfinas, aisladas del extracto de hipotálamo e hipófisis. Estos hallazgos han sido corroborados por otros autores en varias especies de vertebrados. Hasta el momento se conocen alrededor de 40 péptidos endógenos que se unen a los mismos receptores que el opio, son agonistas de la morfina y se sintetizan endógenamente. A estos se les conoce con el nombre genérico de péptidos opioides, a diferencia de las sustancias derivadas del opio y sus derivados sintéticos a los que se les llama opiáceos.

PRECURSORES DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES.

Con ayuda de las técnicas de DNA recombinante y de la química de proteínas se ha demostrado que todos los péptidos opioides provienen de tres proteínas precursoras inactivas que son: la proopiomelanocortina (POMC) (Nakanishi y col., 1979), la Proencefalina A (PEF) (Comb y col., 1982); Gubler y col., 1982; Noda y col., 1982), y la Prodinorfina o Proencefalina B (PDF) (Kakidani y col., 1982) (Fig. 1). Estas tres proteínas con sus péptidos derivados (Tabla

I) representan los tres sistemas opioides conocidos y que se distribuyen de manera diferente en el SNC. Según su estructura, y como se observa en la Fig. 1, las tres moléculas precursoras de péptidos opioides tienen varias características en común: a) peso molecular cercano a 30 000 daltons, b) un número similar de aminoácidos, 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. Posiblemente el significado biológico de los precursores de multihormonas es la producción simultánea de péptidos activos los cuales actuarían de una manera coordinada en respuesta a perturbaciones que dieran origen a un control fisiológico.

BIOSINTESIS DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES

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 en 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 postraduccional de la promolécula ocurre

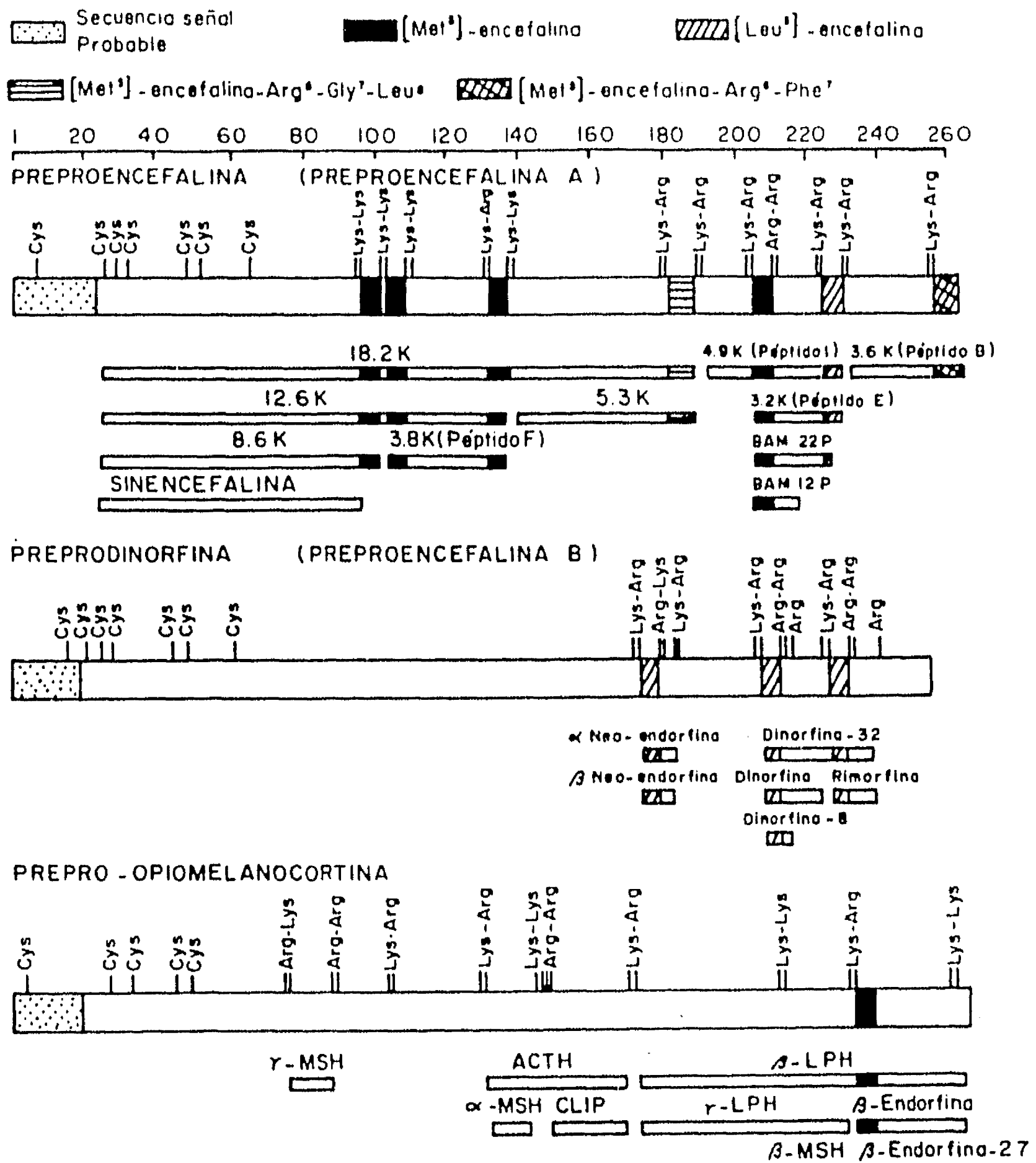


Figura 1. Representación esquemática del proceso proteolítico de las tres prohormonas que contienen péptidos opioides. Están señalados los aminoácidos básicos ya sean sencillos o en pares. Se ilustran únicamente los péptidos aislados y secuenciados en mamíferos. Esta figura es una modificación de los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

durante la migración desde el RER hacia el exterior de la célula, con pasos individuales de maduración (hidrólisis, sulfatación, glicosilación, amidación, etc.), da origen a los péptidos opioides, los cuales se encuentran 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.

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 POMC se ha encontrado que la enzima o enzimas involucradas en su procesamiento están en los gránulos de secreción y presentan propiedades acil-tiol-arginil proteasa (Chang y col., 1982). También se identificó una enzima del tipo de la catepsina D que rompe selectivamente a la BE hacia γ -endorfina (Graf y col., 1979).

La ruptura de la proencefalina a nivel de aminoácidos básicos se atribuyó 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 adjudicó a una carboxipeptidasa dependiente de cobalto (Fricker y Snyder, 1983).

Los péptidos derivados de la prodinorfina se generan por rompimientos a nivel de pares

TABLA I

FAMILIA DE PEPTIDOS OPIOIDES

B-Endorfina (ACTH) (porcina)	Proencefalina (humana)	Prodinorfina (porcina)
β-Endorfina Tir-Gli-Gli-Fen-Met- Thr-Ser-Glu-Lis-Ser- Gln-Thr-Pro-Leu- Val-Thr-Leu-Fen-Lis- Asn-Ala-Ile-Val-Lis- Asn-Ala-His-Lis- Lis-Gli-Gln	Met-encefalina Tir-Gli-Gli-Fen-Met	Alfa-neo-endorfina Tir-Gli-Gli-Pen-Leu- Arg-Lis-Tir-Pro-lis
	Leu-encefalina Tri-Gli-Gli-Fen-Leu	Beta-Neo-endorfina Tir-Gli-Gli-Pen-Leu- Arg-Lis-Tir-Pro
	Met-encefalina-8 Tir-Gli-Gli-Pen-Met Arg-Gli-Leu	Dinorfina A-(1-8) Tir-Gli-Gli-Fen-Leu Arg-Arg-Ile
	Met-encefalina-7 Tir-Gli-Gli-Pen-Met- Arg-Fen	Dinorfina A-(1-17) Tir-Gli-Gli-Fen-Leu Arg-Arg-Ile-Arg-Pro Lis-Leu-Trp-Asp- Asn-Gln
	Péptido E Tir-Gli-Gli-Fen-Met- Arg-Arg-Val-Gli-Arg- Pro-Glu-Trp-Trp-Met- Asp-Tir-Gln-Lis-Arg- Tir-Gli-Gli-Fen-Leu	Dinorfina B-(1-13) Tir-Gli-Gli-Fen-Leu- Arg-Arg-Gln-Fen-Lis- Val-Val-Tir

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 de donde proviene la β-Endorfina, la Proencefalina A, precursor de las encefalinas y la Proencefalina B o Prodinorfina, precursor de las dinorfinas. Modificado de Akil y col. (1984).

de aminoácidos básicos, por lo que se propone la participación de enzimas semejantes a las propuestas para la proencefalina (Fischli y col., 1982; Graf y col., 1979); la rimorfina (Kilpatrick y col., 1982) y la dinorfina 1-8 (Minamino y col., 1980) se liberan por rompimiento de un solo residuo de Arg. En ambos casos se sugiere la participación de una enzima del tipo de la tripsina.

Recientemente se ha demostrado que las enzimas de la familia de las subtilisinas como la furina, y las prohormonas convertasas, PC1 y PC2, son capaces de procesar a los precursores en los sitios de pares de aminoácidos básicos como lis-lis y en sitios monobásicos lis (Seidah 1992a y b; Vindrola y Linberg, 1993). Las enzimas PC1 y PC2 se distribuyen en tejido nervioso, médula suprarrenal e hipófisis. Braks en 1992, clonó el cDNA de la PC2 del *Xenopus laevis* y reportó una gran homología con la de mamífero, lo que indica un alto grado de conservación de esta enzima durante la evolución de los vertebrados. Estas enzimas procesan otras prohormonas y se ha reportado colocalización en neuronas productoras de la hormona liberadora de tirotrópina en tectum óptico y tallo cerebral del *Xenopus laevis* (Hutton 1990; Pu, 1995).

LIBERACION DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES

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). Todos estos trabajos han mostrado que la liberación inducida por pulsos despolarizantes de potasio es un proceso dependiente de calcio por lo que se presupone que estos neuropéptidos se comportan como otros neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC). En este punto, hemos reportado que la liberación de encefalinas en los ganglios periesofágicos del caracol *Helix aspersa*, es dependiente de calcio y se puede provocar mediante estímulos despolarizantes con alto

potasio (Pellicer y col., 1993).

DISTRIBUCION DE LOS PRECURSORES OPIOIDES Y SUS DERIVADOS.

Los péptidos derivados de la POMC se han encontrado en concentraciones altas en la glándula hipófisis por medio de técnicas de radioinmunoensayo e inmunohistoquímica (Bloom y col., 1977; Mendelsohn y col., 1979). En el cerebro, estos péptidos se producen en los somas neuronales del núcleo basal medial hipotalámico y en sus proyecciones que están ampliamente distribuidas en diferentes áreas del SNC incluyendo al sistema límbico y al tallo cerebral. El efecto postraducciona l de los precursores es diferente para la hipófisis y para el cerebro: la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y la β -lipotropina son los productos principales en la hipófisis humana. En el cerebro son la α -melanocito estimulante (α -MSH) y la BE (Watson y Akil, 1980; Zakarian y Smyth, 1982). La POMC es la única de los tres precursores de los péptidos opioides que da origen a otros péptidos que no tienen propiedades opioides.

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

La prodinorfina contiene la secuencia de la LE en la porción amino terminal (NH₂) (Kakidaniy col., 1982). Existen evidencias de que en el sistema nigro estriatal, la LE que contienen las neuronas de esta región proviene de la Prodinorfina (Zamir y col., 1984). La inmunorreactividad a dinorfinas se ha encontrado especialmente en el área hipotalámica,

principalmente en las neuronas que contienen vasopresina del núcleo magnocelular y que proyectan a la neurohipófisis (Watson y col., 1977 y 1981; Weber y col., 1981). Estudios de inmunocitoquímica con microscopía electrónica demuestran que en neuronas del núcleo magnocelular la dinorfina 1-8 que contienen, está en las mismas vesículas que la vasopresina y la vasopresina asociada a la neurofisina (Weber y col., 1981). Estos reportes de coliberación sugieren un mecanismo de modulación opioidérgica sobre la liberación de vasopresina.

La inmunorreactividad a dinorfinas se ha encontrado también en tallo cerebral, amígdala cerebral 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., 1977; 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.

RECEPTORES DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES

El descubrimiento de los receptores estereoespecíficos a la morfina precedió al aislamiento y caracterización de las endorfinas, que son sus ligandos endógenos. Desde 1954, Beckett y Casy (1954) presentaron la hipótesis de que las drogas opiáceas ejercen sus efectos vía un receptor específico. Esta hipótesis se fundamentó en los datos de la estructura, actividad y estereoespecificidad de los compuestos conocidos. Sin embargo, no fue hasta 1973 en que se pudieron marcar los sitios de unión estereoespecífica con ligandos apropiados en membranas

cerebrales (Terenius, 1973; Pert y Snyder, 1973; Simon et al., 1973). El desarrollo de los ligandos y bioensayos permitieron los estudios de afinidad de unión a receptor de los extractos de cerebro e hipófisis, (Terenius y Wahlstrom, 1974; Hughes, 1975; Hughes y col., 1975; Pasternak et al., 1982). La existencia de clases separadas de receptores fue propuesta primero por Martin y col. en 1976, con base en las diferentes respuestas fisiológicas obtenidas al probar diversos tipos de opiáceos en la preparación de perro espinal crónico. Ellos propusieron tres tipos de receptores: μ para los compuestos como la morfina, κ para las drogas como la cetociclazocina, y σ para las drogas como la N-alilnormetazocina. Además de estos tipos de receptores, Kosterlitz, y col. (1979) aportaron evidencias sobre un cuarto tipo de receptor al que denominaron delta (δ). Los resultados de los experimentos farmacológicos fueron corroborados con ensayos de unión a receptor, y los estudios de autorradiografía demostraron que los receptores μ , δ , κ , son distintos sitios de unión, que se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC de diferentes especies animales (Chang y col., 1979; Chang y Cuatrecasas, 1979; Pert y col., 1974; Bonnet y col., 1981; Lewis y col., 1982; Ninkowic y col., 1981; Martin, 1983). 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 ligandos selectivos para cada uno de ellos. Por ejemplo, ligandos que causen analgesia, pero no depresión respiratoria.

La morfina se une principalmente al receptor μ y es antagonizada por la naloxona (Chang y Cuatrecasas 1979). Se han identificado 2 tipos de receptores μ : $\mu 1$ 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, 1982). Las encefalinas muestran una afinidad preferencial por los receptores δ (Lord y col., 1977). Estos receptores tienen un papel importante en la depresión respiratoria (Freye y

col., 1982) y parecen no mediar la analgesia; las deltorfinas, péptidos opioides descubiertos en la piel de los anfibios tienen una alta afinidad y selectividad por el receptor δ (Erspamer, 1980; Richter y col., 1990). Los receptores κ 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 y col., 1976). Cuando el péptido crece en longitud hacia el carboxilo (COOH)-terminal de la LE se va perdiendo la selectividad a los receptores δ y se va incrementando la selectividad a los κ (Paterson y col., 1983); así la dinorfina, la α - y β -neoendorfina son agonistas κ . Los receptores menos conocidos son los σ ; sin embargo, son los que tienen más interés para la psiquiatría clínica ya que las drogas agonistas σ tienen potentes efectos psicomiméticos. La existencia de los receptores ϵ han sido propuestos para la BE, en contraste con los ligandos clásicos μ y δ , que tienen una alta potencia en el conducto deferente de la rata.

Desde 1992, se presentaron importantes progresos en el conocimiento de las características moleculares de los diferentes tipos de receptores, por la clonación de sus cDNAs y sus genes. Los receptores opioides pueden ahora ser clasificados por su estructura genómica y las homologías de sus secuencias. Estos genes proveen evidencias de la existencia de los receptores μ , κ y δ . La clonación del receptor opioide δ dió como resultado la identificación de las subfamilias de genes de los diferentes receptores opioides. Kiefer y col. (1992) y Evans y col. (1993), en diferentes trabajos describieron subtipos de cDNAs de las bibliotecas de expresión celular en la célula NG108-15. Estas células manifiestan sitios de unión similares a los encontrados en el cerebro, pero los niveles de mRNA son más de 100 veces más altos. Los cDNAs de éstas, despliegan secuencias virtualmente idénticas a las encontradas en las clonas de cDNAs del cerebro. Estas secuencias de los receptores δ codifican proteínas con siete dominios hidrofóbicos

transmembranales y presentan gran homología con las subfamilias de receptores a somatostatina y otros neuropéptidos acoplados a proteínas G. El receptor clonado representa al subtipo δ_2 . El receptor δ humano es codificado por un gene que contiene un intrón localizado en el cromosoma 1p34.

Receptores μ :

Con la utilización de estrategias parecidas a las que se usaron para clonar los receptores δ , como son el uso de preparaciones de receptores purificadas y la microsecuenciación de proteínas, se clonaron los receptores a opioides μ (Fukuda y col., 1993; Chen y col., 1993; Wang y col., 1993; Thompson y col., 1993). Estos receptores tienen una alta afinidad a la morfina. El gen que codifica al receptor μ tiene más de 50kb, e intrones con varios dominios funcionales separados; está localizado en el cromosoma humano 6q25.

Receptores κ :

La descripción de la clonación de los receptores opiáceos κ de ratón y de rata (Yasuda y col., 1993; Chen y col., 1993b; Meng y col., 1993; Minami y col., 1993) se hizo a partir de las mismas estrategias de clonación que para los δ y μ . Previamente, G. Bell (citado en Yasuda y col., 1993) había caracterizado los cDNAs como clonas ORPHAN (huérfanas) identificadas en investigaciones de receptores de somatostatina. Este receptor tiene una alta afinidad por los péptidos derivados de la prodinorfina. El receptor humano κ es codificado por un intrón contenido en un gen del cromosoma 8. Pasternak y Standifer (citado en Uhl y col., 1994) con oligonucleótidos complementarios inversos (antisense) describieron una clona KORB que presenta inhibición de la analgesia κ específica en vivo, sugiriendo que esta clona codifica un verdadero subtipo de receptor κ .

Receptor ϵ :

Una posible segunda subfamilia genética puede ser la del receptor ϵ , identificado por estudios de homología genética para receptores δ , (citado en Uhl y col., 1994). Se describe un grupo de intrones de genes humanos que codifican homólogos de la familia de receptores, en donde la secuencia de amino ácidos presenta una homología del 36-39%, con respecto a los receptores μ , δ , κ que es menor a la homología que hay entre estos últimos (60-70%). Estos productos de genes unen β -endorfina y tienen las características del receptor ϵ descrito previamente, con una afinidad para la β -endorfina un poco más que la nanomolar sugerida en los estudios de unión a receptor ϵ . El gen está localizado en el cromosoma 10q 11.2-21.1 en humanos (tabla II).

RECEPTORES EN LA GLANDULA HIPOFISIS

Los agonistas de los receptores opioides tienen efectos amplios sobre la liberación de las hormonas, incrementan la liberación de la prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), POMC y corticoesteroides; Así mismo, disminuyen la liberación de la hormona luteinizante (LH), oxitocina (OXY) y arginina vasopresina (AVP) (Mansour y col., 1995).

Simantov y Snyder (1977) y Lightman col. (1983) reportaron la existencia de receptores opioides en el lóbulo neural y principalmente sobre los pituicitos. Bunn y col. (1985) reportaron por autorradiografía la existencia de receptores κ , en los pituicitos de la neurohipófisis de rata. Herkenham y col. (1986) en estudios de unión a receptor en rebanadas de hipófisis de rata, con radioligandos antagonistas μ , δ , κ , concluyen que el único receptor existente en la hipófisis es de tipo κ , y está en las terminaciones nerviosas y en los pituicitos de la neurohipófisis.

TABLA II**CARACTERISTICAS DE LOS RECEPTORES CLONADOS**

	Mu	Delta	Kappa
Familia genética	7TM acoplado a proteína G	7TM acoplado a proteína G	7TM acoplado a proteína G
Organización genética	Intrónica	Intrónica	Intrónica
Tamaño del mRNA	398	372	380
Características de enlace	DAMGO Morfina CTOP	DPDPE DSLET Naltrindol	U50488 DYN A (1-17) nBNI
Traducción de la señal	Acoplado a prot. G inhibitoria ↓ cAMP	Acoplado a prot. G inhibitoria ↓ cAMP	Acoplado a prot. G inhibitoria ↓ cAMP
Número de sitios de glicosilación	5	2	2
Distribución del mRNA	Tálamo Estriado Locus coeruleus Núcleo del tracto solitario	Corteza Estriado Reticular lateral	Hipotálamo Núcleo acumbens Substancia negra Area tegmental ven. Núcleo del tracto solitario

Los receptores opioides clonados tienen propiedades similares de unión a receptor en homogenados de cerebro. Se presentan dos agonistas y un antagonista que se une a cada uno de los receptores clonados. Las áreas anatómicas enlistadas son ejemplos de las regiones que presentan altos niveles de expresión del mRNA de los receptores μ, δ, κ . Abreviaciones: 7TM, siete transmembrana, CTOP, D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr; DAMGO, D-Ala²-MePhe⁴-Gly-ol⁵-encefalina; DPDPE, δ -Pen²-D-Pen⁵-encefalina; DSLET, D-Ser²-D-Leu⁵-encefalina; U50488, 3,4-dichloro-N-[2-(1-pyrrolidinyl)-cyclohexyl]benzene acetamide; DYN A (1-17), dinorfina A (1-17); y n-BNI, norbinaltorfimine. Modificada de Mansour y col., (1995).

Los péptidos opioides inhiben la liberación de OXY y VP de la terminales en la neurohipófisis (Clarke y col., 1979), esta inhibición se relaciona con los receptores κ (Iversen y col., 1980). En la hipófisis denervada, después de cuatro semanas hay una pérdida de solo el 7% en la unión a receptor. Esto sugiere que hay una pérdida de los receptores en las terminaciones nerviosas, pero está enmascarada por una regulación a la alza de los receptores de los pituicitos.

Por otro lado Van Leewen y col., (1983), en un estudio de microscopía electrónica, demostró terminales leu-encefalinérgicas "tipo sinapsis" (sin engrosamiento de la membrana en los sitios de contacto, pero con vesículas) sobre los pituicitos del lóbulo neural.

Hasta el momento se puede decir que las evidencias sugieren que hay dos formas de interacción entre los péptidos opioides y los receptores κ , una sobre los receptores de las terminales y la de los pituicitos "tipo sinapsis", y otra de forma paracrina. Aunque la LE tiene una baja afinidad por los receptores κ , puede ser que se libere en grandes concentraciones fisiológicamente activas en los receptores de los contactos "tipo sinapsis".

Bzdega y col. (1993), en estudios de hibridización in situ para receptor δ , localizan el RNAm en algunos núcleos del cerebro de la rata y principalmente en la adenohipófisis y la glándula pineal. Ellos mencionan que la hipófisis y la pineal están fuera de la barrera hematoencefálica por lo que los opioides endógenos podrían llegar vía sanguínea o de forma paracrina, y actuar inhibiendo la liberación de la hormona luteinizante y estimulando la secreción de prolactina.

FISIOLOGIA DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES

Actualmente se tienen bastantes evidencias de que los péptidos opioides actúan como

substancias 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 substancia que se considere como neurotransmisora. Desde su descubrimiento, las encefalinas y las endorfinas, que son péptidos endógenos con propiedades parecidas a la morfina, han sido examinadas por sus cualidades analgésicas. Sin embargo, gracias a las numerosas investigaciones realizadas desde la década pasada se ha establecido la participación de estos péptidos en muchas otras funciones, como en los procesos de modulación de la información sensorial, en la fisiopatología del estrés, en la regulación de los sistemas cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, renal y neuroendócrino, en la termorregulación, en la regulación de la ingesta de alimentos e hidratación, en la regulación de funciones como la conducta sexual, la locomoción, el crecimiento, memoria y aprendizaje, y su participación en desórdenes mentales y neurológicos como la esquizofrenia y la epileptogénesis. De manera reciente se les ha relacionado también con el sistema inmunológico y el desarrollo del cáncer (ver revisión de Olson y col. 1989 y 1994).

LOS PEPTIDOS OPIOIDES EN LA ESCALA FILOGENETICA

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. (Leung y Stefano, 1984; Gustafsson y col., 1986; Cone y Goldstein, 1983; Takahashi y col., 1984; Pestarino, 1975; Bayón y col., 1980; Bayón y col., 1980b; Brauth, 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 Stefano, 1984; Santoro y col., 1985; León-Olea y col., 1987). Los resultados de investigaciones sobre el comportamiento, la fisiología y la farmacología en moluscos muestran que los péptidos opioides endógenos así como los antagonistas y agonistas exógenos semejan las acciones de los opioides encontrados en los mamíferos (Josefsson y Johansson, 1979; Kavaliers y Hirst, 1986; Kavaliers y col., 1985). Por los estudios de unión estereoespecífica de alta afinidad para ligandos opioides con propiedades similares a las del tejido nervioso se ha encontrado que éstos están presentes en vertebrados inferiores, moluscos y otras especies de invertebrados (Stefano y col., 1980; Stefano y col., 1982). Estas observaciones implican que hubo un desarrollo evolutivo temprano y una continuidad filogenética de los péptidos opioides y sus receptores. Además los estudios de Zipser y col. (1985), efectuados por cruzamiento molecular, sugieren que los receptores opiáceos han permanecido estables a través de la escala evolutiva.

PEPTIDOS 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). En 1984, Martens y Herbert, (1984), encontraron, por medio de técnicas de biología molecular que en la rana *Xenopus laevis* la estructura primaria de los principales exones de los genes de la proencefalina codifican 7 secuencias de ME, pero ninguna secuencia de LE. Las posiciones de la ME dentro de la secuencia de la pro-encefalina son las mismas que en la secuencia de la pro-encefalina de mamíferos, pero el lugar que le correspondería a la LE está ocupado por una copia de ME. Por lo tanto, en la pro-encefalina del *Xenopus laevis* no está contenida la secuencia de la LE, y la LE que se encuentra en éste puede provenir de la prodinorfina (Fig. 2).

La presencia de POMC y sus derivados se ha encontrado en el lóbulo neurointermedio de la hipófisis de la rana *Xenopus laevis* y la *Rana rudibunda* (Vaudry y col., 1984). Leboulenger y col., (1984) demostraron la presencia de encefalinas en los gránulos cromafines de la rana. Con la técnica de cromatografía de filtración en gel sobre extractos ácidos de cerebro de *Buffo marinus* se encontraron ME, LE, y heptapéptido libres. La dinorfina (1-13) está presente en la hipófisis, cerebro y médula espinal del sapo *Buffo marinus* (Kilpatrick y col., 1983). Asai y col., (1988) con técnicas de radioinmunoanálisis (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 ME por 1 de LE (pmol por g de tejido), la proporción es diferente para lo encontrado en mamíferos que es de 4 ME por 1 LE (5). Ellos

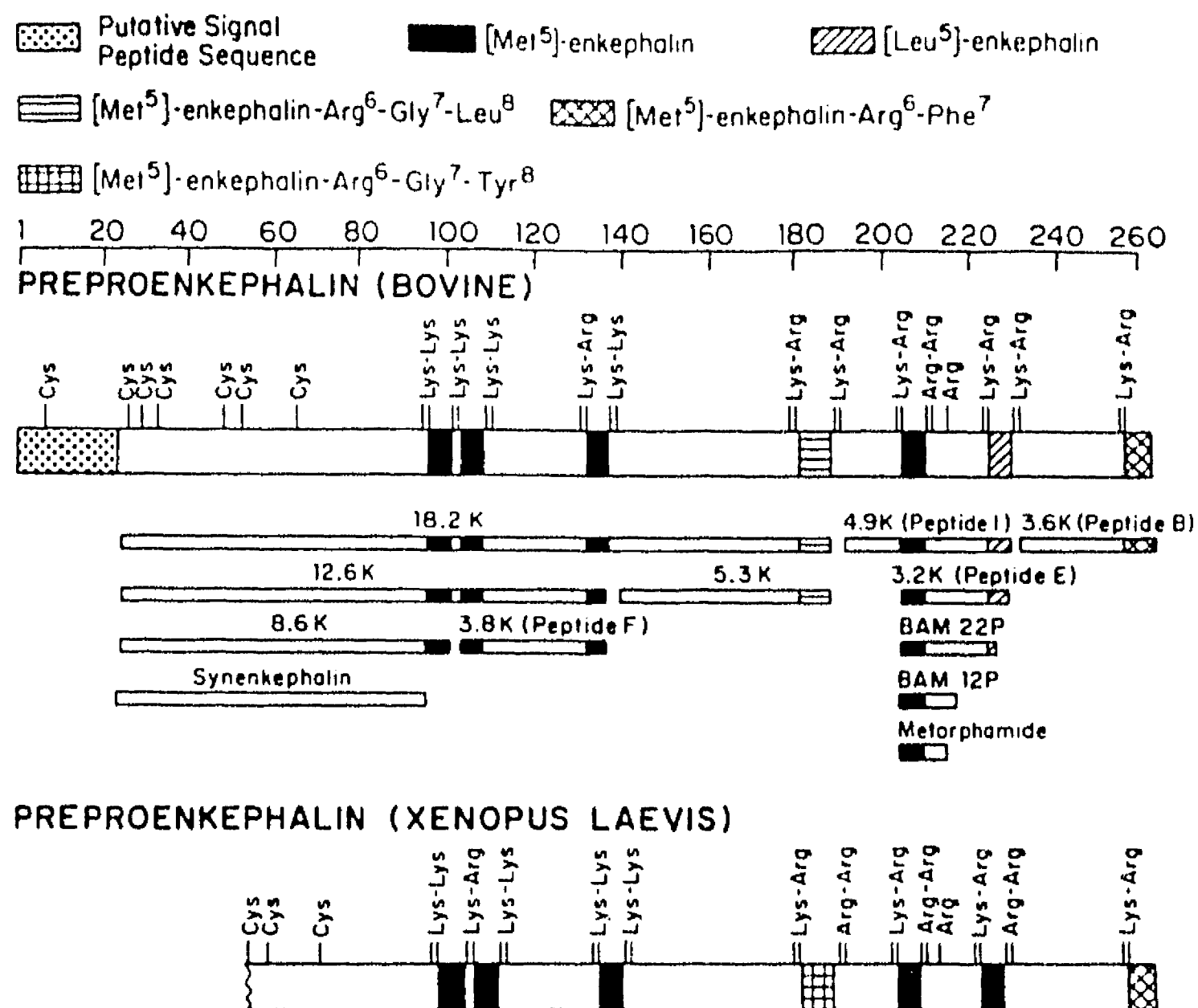


Figura 2. Representación esquemática de la estructura y procesamiento de la proencefalina bovina (arriba) y la del *Xenopus laevis* (abajo). Se indican los aminoácidos únicos o en pares, que sirven como sitios de procesamiento. Se ilustran también los intermediarios que han sido aislados y caracterizados por métodos bioquímicos de uno o más tejidos de bovino. En el *Xenopus*, no se han aislado péptidos intermediarios, tampoco se conoce la secuencia amino terminal de la proencefalina. Nótese la ausencia de la secuencia de la LE en la proencefalina del *Xenopus*. Este esquema (original) tomado del trabajo de Merchantaler y col., (1989), es una modificación de los trabajos de Kilpatrick y col., (1983) y Maderdrut y col., (1986). La secuencia de los aminoácidos de la proencefalina se tomó del trabajo de Martens y Herbert, (1984).

cuantificaron la concentración de las encefalinas (LE y ME) en tres regiones cerebrales (telencéfalo, diencéfalo y rombencéfalo) y en la glándula hipófisis. La proporción ME:LE fue de 9:1 en las regiones cerebrales y de 2:1 en la glándula hipófisis. Posteriormente también en nuestro laboratorio se llevó a cabo la distribución de encefalinas en el cerebro del axolotl por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Encontramos una distribución similar a la de los

mamíferos y otros vertebrados (Tabla III). En telencéfalo, la concentración de fibras y neuronas inmunorreactivas a encefalinas fue principalmente en el complejo estriamigdalino y en la región septal. El diencefalo fue la estructura cerebral en donde hubo una mayor concentración de neuronas y fibras inmunorreactivas a encefalinas principalmente en los núcleos preópticos, en el epitálamo, en los núcleos habenulares, en la parte ventral del tálamo. En los núcleos hipotalámicos; en el mesencéfalo, se encontraron fibras IR en el tectum y en el tegmentum, así como neuronas IR aisladas. En los núcleos interpedunculares fibras y neuronas IR. En el

TABLA III.

Distribución de neuronas y fibras inmunorreactivas a LE y ME en el sistema nervioso central del axolotl (*Ambystoma mexicanum*)

Estructuras	LE		ME	
	NIR	FIR	NIR	FIR
Telencéfalo				
Bulbo olfatorio	0	++	0	+
Palio dorsal	0	+	0	+
Palio piriforme	0	+	0	+
Palio hipocampal	.	++	.	+++
Núcleos septales	.	+++	.	+++
Núcleo accumbens	0	+++	0	+++
Cuerpo estriado	0	+++	0	+++
Núcleo amigdalino	0	++++	0	++++
Núcleo caudado	0	+++	0	+++
Comisura anterior	.	+++	.	+++
Comisura hipocampal	.	+++	.	+++
Tractos ventrales	0	+++	0	+++
Diencefalo				
Núcleos habenulares	0	+++	0	+++
Núcleo preóptico	▲	++++	▲	++++
Núcleos talámicos	▲	++++	▲	++++
Núcleos hipotalámicos	■	++++	■	++++
Mesencéfalo				
Tectum	.	++	.	++
Tegmentum	0	++	0	++
Istmo	0	+	0	+
Cerebelo	0	.	0	.
Rombencéfalo				
Médula oblongada	0	.	0	.
Zona sensorial	.	++	.	++
Formación reticular	.	+++	.	+++
Zona motora	.	+++	.	+++

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

rombencéfalo, la médula oblongada presenta en sus tres zonas: sensorial, formación reticular y motora fibras IR tanto para LE como para ME. En el límite de la formación reticular y en la zona motora a nivel del núcleo del VII nervio craneal existen grupos de neuronas IR a LE y en el núcleo del fascículo solitario (Sánchez-Islas y col., 1993).

Actualmente se llevan a cabo, estudios inmunohistoquímicos de los péptidos opioides, en la ontogenia del axolotl, desde la formación del sistema nervioso hasta la larva de tres meses de edad. Estos estudios han demostrado IR a encefalinas desde estadios muy tempranos de la formación del SNC del axolotl (Sanchez-Islas y col., 1994 y 1996).

Dores y col., (1993), detectaron la presencia de ME y LE en extractos ácidos de cerebro de la salamandra del *A. tigrinum*, por medio de la técnica de RIA y HPLC; la proporción fué de 80 de ME para 1 de LE. Esta observación sugiere que la LE detectada puede derivarse de otro precursor diferente a la proencefalina. El octapéptido (MERGL) y el heptapéptido (MERF) no fueron detectados. Por lo anterior, la ME es el péptido principal que se libera del gen de la proencefalina en estos urodelos y apoya el hecho de que la proencefalina de los urodelos como la de los anuros no contenga la secuencia de la LE. En este trabajo se detectaron también dos derivados de la prodinorfina; la α -neoendorfina y dinorfina B(1-13). No se encontró ni dinorfina A(1-17) ni la dinorfina A(1-8). Ellos mencionan que la dinorfina A de los anfibios es significativamente diferente a la dinorfina de los mamíferos.

Los receptores opiáceos también se han encontrado en el SNC de los anfibios (Buatti y Pasternak, 1977; Ruegg y col., 1981; Simon y col., 1984 y 1985), en donde se ha demostrado que existen sitios de unión tipo mu, delta y kappa. 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.

DISTRIBUCION DE LOS PEPTIDOS OPIOIDES EN LA GLANDULA HIPOFISIS.

Se ha reportado la existencia y las posibles funciones de los péptidos opioides en la glándula hipófisis de 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, 1983; Goldstein y Ghazarossian, 1980; Bayón y col., 1980). La dinorfina y la BE se han localizado en el lóbulo intermedio (Cone y Goldstein, 1983; Goldstein y Ghazarossian, 1980; Martens y col., 1985; 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. (1987), reportan altas concentraciones de este péptido en el lóbulo anterior de la rata; sin embargo, Goldstein y Ghazarossian, (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, 1983). El único reporte de la existencia de encefalinas en la meta-adenohipófisis, que corresponde al lóbulo intermedio en los mamíferos, es el de Dores y col. en la lamprea (1984). Nosotros hemos realizado estudios inmunohistoquímicos de la distribución de los péptidos opioides en el hipotálamo y la hipófisis del *A. mexicanum* adulto neoténico, y reportamos que existe inmunorreactividad (IR) a LE, ME, BE y Din (1-8) con una distribución característica: La IR-LE se encuentra en neuronas del hipotálamo cercanas al infundibulum, en fibras de la neurohipófisis y en células de la adenohipófisis, la IR-BE está

presente en todas las células del lóbulo intermedio, en algunas células del lóbulo anterior, y en algunas neuronas del hipotálamo; la IR-Dinorfina en fibras de la neurohipófisis, y en neuronas del hipotálamo; la IR-ME, en fibras de la neurohipófisis y en neuronas del hipotálamo (León-Olea y col., 1986 y 1989).

LOS PEPTIDOS OPIOIDES Y SU RELACION CON LA NEUROENDOCRINOLOGIA

Existen evidencias de una modulación opioidérgica en la secreción de hormonas hipofisiarias en el hombre y en los vertebrados inferiores. Se ha visto que en el hombre estos péptidos juegan un papel importante con respecto a la liberación de gonadotropinas, ACTH, oxitocina 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 foliculo estimulante (FSH). Estos efectos son más notables sobre la LH y su magnitud varía dependiendo de la fase menstrual, a dosis bajas de naloxona incrementan su concentración (Ropert y col., 1981; Ellingboe y col., 1982), 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 y Kalra, 1984). También se ha 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); esto 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 neurosecretoras 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 κ producen diuresis en los animales con hidratación normal (Slizgi y Ludens, 1982; Leander, 1983). Este efecto se debe probablemente a la inhibición de la liberación de la vasopresina en la neurohipófisis (Iversen y col., 1980; Grossman y col., 1980). La especificidad de la dinorfina por los receptores κ , además de la colocalización 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 están en los pituicitos 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 pituicito. 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). 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.

**CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS GENERALES DEL
AXOLOTL *Ambystoma mexicanum*,**

Clasificación Taxonómica. (Weichert y Presch, 1981).

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

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 obligado inducible, esto quiere decir que no sufre metamorfosis a menos que se induzca experimentalmente, por ejemplo mediante la administración de tetrayodotironina (T_4) lo que desencadena una serie de eventos metabólicos que producen la transformación. El axolotl además llega a la madurez sexual en estado larvario y se reproduce conservando su morfología de larva

(Smith y Smith, 1971). Existen diferentes subespecies de *Ambystoma mexicanum*; sin embargo, la más conocida es la del axolotl oscuro del Lago de Xochimilco y la del *Ambystoma tigrinum* que se encuentra en los Estados Unidos, suroeste de Canadá, y en las ciudades de Puebla y Michoacán. El cuerpo de la larva está formado por cabeza, tronco y cola. Anatómicamente se parece mucho a su forma adulta, las branquias están en la parte lateral y posterior de la cabeza y presenta dos pares de extremidades débiles en el tronco. En el estado adulto se conoce como salamandra y pierde las branquias, sus extremidades se adaptan para la locomoción y desaparecen las aletas dorsal y ventral. 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 se sabe que el SNC contiene 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 (Herrick, 1948), (Fig. 3).

GLANDULA HIPOFISIARIA

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

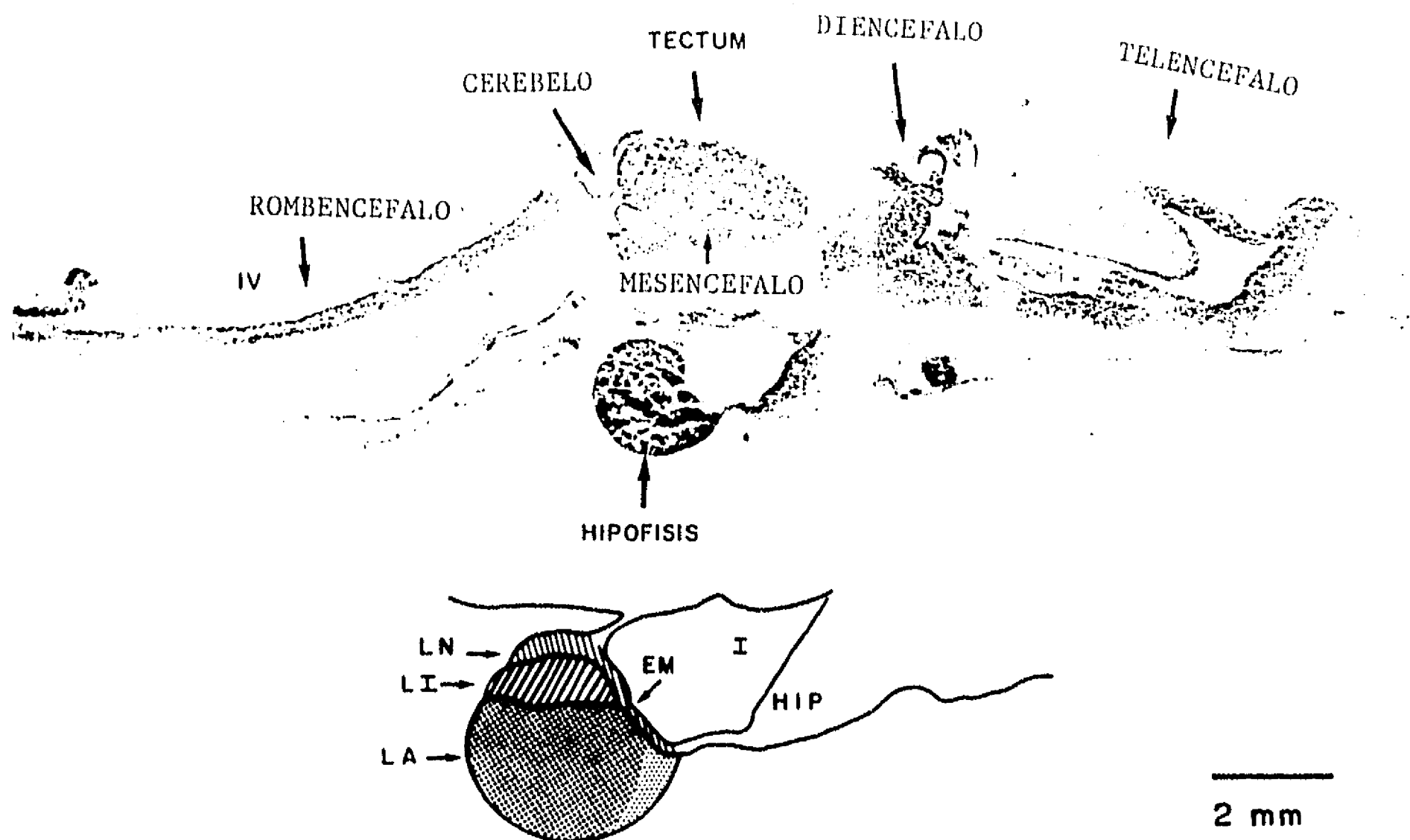


Figura 3. Fotomontaje de un corte parasagital (10μ), del cerebro e hipófisis del axolotl *Ambystoma mexicanum*, se muestran las diferentes estructuras cerebrales y la hipófisis (tinción de Nissl). Esquema de la hipófisis (abajo), donde se muestran sus diferentes lóbulos: anterior (LA), intermedio (LI) y neural (LN), y la relación con la eminencia media (EM), el infundíbulo (I) y el hipotálamo (HIP).

adenohipófisis y conectada con ella por medio de los vasos portales. La eminencia media se continua con la neurohipófisis, la cual está formada por pituicitos y terminaciones nerviosas provenientes del hipotálamo, de las neuronas magnocelulares neurosecretoras del núcleo supraóptico y paraventricular y del núcleo preóptico en donde se origina el tracto hipotálamo hipofisiario, 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, que está formada por axones y sus terminales. Este lóbulo sirve para el control nervioso de la actividad endócrina. El lóbulo intermedio está bien diferenciado. El lóbulo anterior en el caso del axolotl es la porción más caudal, está formado por cordones de células glandulares dispuestos entre los espacios vasculares. Las hormonas secretadas en la adenohipófisis o pars distalis son seis: ACTH, prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), la LH y FSH también llamadas gonadotrópicas. En anfibios, reptiles y pájaros la distribución de las células secretorias difiere entre la parte rostral y la caudal: ACTH y PRL predominan en la región rostral, GH en la caudal. La FSH, LH y TSH son hormonas glicopeptídicas compuestas por una subunidad α y otra β . La subunidad α es idéntica en su secuencia de amino ácidos para las tres hormonas y difieren en la subunidad β (contra la cual se hacen los anticuerpos) y tienen otras secuencias que son especie específicas. Tanto las células que producen ACTH como las células PRL tienen dos o tres tipos de células estructuralmente distintas. Las células PRL y LH pueden secretar estas dos hormonas. También un solo tipo de célula puede producir y secretar dos o más clases de hormonas. Con las tinciones de rutina la adenohipófisis tiene células cromóforas, dos tipos de acidófilas y cuatro tipos de basófilas. En los anfibios, el lóbulo intermedio secreta principalmente la hormona melanocito estimulante (MSH) que proviene del precursor proopiomelanocortina que da origen a la ACTH y a la β -endorfina entre otras. Con tinciones de rutina se ha observado que tiene células cromóforas y

basófilas (Mikami, 1992).

METAMORFOSIS

Del griego meta μετα, cambio y morfon μορφη, forma. Con el término metamorfosis se hace referencia a la serie de profundas modificaciones morfológicas, estructurales y fisiológicas que presentan algunos animales a lo largo de su desarrollo desde el estado larvario hasta la fase definitiva o adulta. Aunque el fenómeno se da en diferentes grupos zoológicos, incluidos ciertos gusanos, crustáceos e incluso peces como la anguila, el término se aplica más específicamente a las transformaciones que acontecen en diversos órdenes de insectos y entre los anfibios. Se verifican en un periodo corto y en ella se forman nuevos órganos y tejidos, propios del estado adulto, y se destruyen otros que sólo son funcionales durante la vida larvaria.

La metamorfosis en los anfibios (El término "Anfibio" del griego amphi = de uno y otro lado bios = vida) indica dos modos de vida completamente diferentes para estos individuos. La larva es acuática y el adulto es terrestre en mayor o menor grado. Estos cambios van acompañados de transformaciones en la estructura y la función del cuerpo para hacer frente a las demandas del nuevo medio ambiente. Estos cambios son de tres tipos: regresión de las estructuras y funciones que son necesarias para el estado larvario; transformación de las estructuras larvarias en formas útiles para el estado adulto y desarrollo *de novo* de estructuras y funciones esenciales en el adulto, que no estaban presentes en la larva. Estos cambios son más notables en los anuros (ranas y sapos), cuyas larvas, carentes de extremidades tras la eclosión del huevo, están provistos de cola, branquias y una especie de pico córneo, adaptados para la vida acuática, rasgos que perderán en el curso de la metamorfosis. Al mismo tiempo, inducidas por la acción de la

hormona tiroidea, tendrán lugar notables transformaciones que afectarán a todo el organismo, como son el desarrollo de las extremidades, la osificación del esqueleto y la aparición de los pulmones, para su adaptación a la vida terrestre. Además de modificaciones en el aparato circulatorio, digestivo, sistema nervioso etc.

La ventaja evolutiva que la metamorfosis confiere a los animales que la poseen estriba en la capacidad de éstos para vivir en medios ecológicos distintos a lo largo de su vida , lo que garantiza, en mayor medida, la supervivencia de la especie ante posibles cambios en el entorno o en el clima.

La metamorfosis en los urodelos está menos estudiada que en los anuros. Los cambios son menos obvios, como la persistencia de la cola. Cuvier en 1828, describe al *Ambystoma mexicanum* como una larva de salamandra desconocida. Estudios posteriores en el siglo XIX demostraron que muchos urodelos pueden llegar a ser sexualmente maduros y permanecer en estado larvario, a lo que se llamó neotenia.

Existen salamandras que raramente presentan metamorfosis y se clasifican como neoténicas obligadas. Son neoténicas facultativas, las que pueden presentar metamorfosis en su medio natural o en el laboratorio. Las neoténicas obligadas como *P.anguinus* y *Necturus spp.* no son sensibles a dosis masivas de hormonas tiroideas aún cuando tienen glándula tiroides funcional. Algunas especies no presentan metamorfosis en su medio natural, pero bajo condiciones de laboratorio y aplicación de hormonas tiroideas pueden presentar metamorfosis. Norris, (1978) las describe como neoténicas obligadas inducibles; en este grupo se incluye al *Ambystoma mexicanum*.

En las especies facultativas como el *Ambystoma tigrinum*, la metamorfosis se presenta

naturalmente cuando viven en aguas templadas; en cambio, cuando viven en aguas frías presentan metamorfosis únicamente bajo condiciones de laboratorio (Jenkin, 1970). Por lo que algunas especies pueden presentar la metamorfosis de forma autónoma dependiendo de las condiciones ambientales y endócrinas. La neotenia es más frecuente en clima frío; cuando las condiciones terrestres son adversas y cuando en el agua no hay predadores (Sprules, 1974)

ASPECTOS ENDOCRINOS EN RELACION CON LA METAMORFOSIS

Gundernatsch, en 1912, observó que la ingestión de tejido tiroideo de caballo por las larvas de la rana causaba una metamorfosis prematura. Esta importantísima observación dió inicio a la endocrinología experimental.

La metamorfosis es un proceso de una gran complejidad, así como, de un alto nivel de integración endocrina.

Se ha demostrado en los últimos años la participación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides en la metamorfosis de los anuros, cualquiera que sea la razón ecológica de mantener la neotenia es evidente que involucra algunas modificaciones en este sistema.

La secreción de T4 es regulada por la secreción de la hormona estimulante de la tiroides en la hipófisis (TSH). Las células productoras de TSH en la hipófisis se desarrollan y son funcionales en el estado de larva, antes de la metamorfosis; sin embargo, esta hormona no se secreta en cantidades detectables hasta después de la metamorfosis. La relación de la TSH y la TH se puede detectar inmediatamente después de la metamorfosis. La TSH a su vez es regulada por el hipotálamo vía la eminencia media, por medio de la hormona liberadora de tirotrófina (TRH).

Los cambios complejos que constituyen la metamorfosis son iniciados y regulados por las hormonas tiroideas (Rosenkilde 1979, Galton 1988, Rosenkilde y Ussing, 1990). En el axolotl, las células TSH y la glándula tiroidea se desarrollan al mismo tiempo que las patas delanteras (Pehlemann 1974). La maduración del SNC coincide con la formación de las patas traseras. En los animales neoténicos se encuentra una baja actividad de la glándula tiroidea (Darras y Kühn, 1984) y una pobre respuesta en los tejidos periféricos (Harris, 1956), (Norris y Platt, 1974). La baja actividad de las hormonas tiroideas puede estar ocasionada por una falta de maduración hipotalámica (que se da hasta la metamorfosis) que a su vez causa una falla en la liberación de TRH, o ausencia de los receptores a TSH (Etkin, 1965). En el axolotl entre 30 y 60 días post eclosión tiene una elevación de tiroxina de entre 20 y 40 nM (Rosenkilde y col., 1982). Este período, en donde se forman las patas, corresponde al período de metamorfosis en las especies que sí se transforman. Después de este período, los niveles séricos de tiroxina vuelven a estar bajos del orden de 2-6 nM. Este pico de tiroxina no es capaz de inducir la metamorfosis, puede ser por una deficiente habilidad para desiodinar la tiroxina (T4) en triyodotironina (T3) que es biológicamente más activa, por una deficiencia en los receptores a la hormona en los tejidos periféricos o en algunos mecanismos celulares post-receptores (Rosenkilde y col. 1982). El incremento en la enzima 5'-desiodinasa (5'D), que convierte la T4 en T3 y el número de receptores de TH requieren un período de activación por la T4, tiempo que puede ser la clave para que el axolotl evada la metamorfosis y permanezca como animal acuático neoténico.

ASPECTOS ENDOCRINOS DE LA NEOTENIA

La neotenia resulta de una disfunción de uno o más de los constituyentes del sistema

endócrino. Por ejemplo; ausencia de la sensibilidad a las hormonas tiroideas en los tejidos de la larva; bajos niveles de actividad en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, que resulta en uno o más de lo siguiente: inhabilidad de la tiroides para secretar hormonas, pérdida de la respuesta de la tiroides a la estimulación de la hormona TSH ó de la hipófisis para secretarla, anormalidades hipotalámicas para liberar la TRH, secreción de altas cantidades de la hormona de crecimiento o prolactina, que tienen un efecto antagonista sobre la TH a nivel de tejidos (Dodd y Dodd, 1976). Es interesante mencionar que la inyección de un antisuero contra prolactina o somatotrofina en anfibios neoténicos facultativos produce la capacidad para metamorfosearse. En los anfibios neoténicos obligados, parecen tener una insensibilidad de los tejidos a la TH. La captación de I^{131} por la glándula tiroides está reducida (Harris, 1956; Norris and Patt, 1974). Sin embargo, pueden responder a la administración exógena de las hormonas tiroideas para iniciar la metamorfosis. Regard (1974) describió la estructura de la tiroides y encontró signos de estimulación hipofisiaria en algunas células, ausencia en otras y en un tercer tipo de células signos de una estimulación intermedia.

Las evidencias indican que en los anfibios urodelos neoténicos facultativos la actividad del eje TRH-TSH-TH es muy baja y la mayoría de los autores sugieren la existencia de un defecto a nivel hipotalámico (Etkin, 1965). La glándula tiroides en el *A. mexicanum* neoténico no tiene una deficiencia de hormonas tiroideas y están presentes en cantidades comparables con las de la *Rana rudibunda* (Kuhn y col., 1985). En los individuos neoténicos *tigrinum* y *mexicanum* hay efectivamente una falta de respuesta a la estimulación de la glándula tiroides por la TSH, lo cual podría explicar la neotenia. Sin embargo, es posible inducir la metamorfosis con TSH de mamífero (Norris y col., 1973; Taurog, 1974; Regard y Taurog, 1977; Larras y col.,

1982) después de esta estimulación las concentraciones en plasma de T3 y T4 aumentan (Norris y Col., 1981; Larras-Regard, 1985). Se ha demostrado que los extractos de hipófisis de axolotl neoténico pueden lograr la liberación de T4 en *Rana rudibunda*, siendo estos un poco menos efectivos que los extractos del mismo anfibio. Cuando se inyectan extractos de la mitad de la adenohipófisis intravenosamente, los niveles de T4 se incrementan 9 veces (Darras y Kuhn, 1983). Estos datos sugieren que los ajolotes permanecen neoténicos ya que no pueden liberar la TSH que contienen.

Es ampliamente conocido que la prolactina es un factor de crecimiento en los anfibios, pero para que se inicie el proceso de metamorfosis se necesita la actividad de la glándula tiroidea (Dodd y Dodd, 1976; Norris, 1978; Rosenkilde, 1979; Kikuyama y col., 1980). Existe una interacción entre la prolactina y las hormonas tiroideas que parece actuar a nivel periférico. La prolactina es capaz de inhibir el efecto metamórfico de T4 y de TSH en el *A. tigrinum* (Platt, 1976; Larras y Regard, 1985). Sin embargo, en el *A. mexicanum*, una inyección de 5 mU de TSH bovina, causa un incremento de la T4 y este incremento no se inhibe con un pretratamiento de prolactina (Darras y Kuhn, 1984). En la interacción de estas hormonas y de su regulación puede estar la respuesta al fenómeno de la neotenia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios previos encontramos inmunorreactividad para LE y para la BE en la adenohipófisis del axolotl *A. mexicanum*, así como inmunorreactividad para ME y dinorfina en fibras de la neurohipófisis (León-Olea y col., 1986; León-Olea y col., 1991). Por otro lado existen evidencias contradictorias sobre los efectos que los péptidos opioides ejercen en la función neuroendócrina. Entre los resultados más claros están los efectos de la BE sobre la prolactina y la hormona del crecimiento. Se ha demostrado que la BE es un liberador de ambas hormonas (Holaday y Loh, 1981), y así mismo que inhibe la liberación de la oxitocina (Clarke y col., 1979), también se han encontrado efectos contradictorios sobre la vasopresina, ya que unos grupos han reportado que este péptido estimula su liberación (Van Vugt y col., 1980; Weitzman y col., 1977), otros que la inhiben (Iversen y col., 1978; Van Wimersma y col., 1979 y 1981) o que no tiene efecto (Reid y col., 1981). Esto sugiere que los péptidos opioides tienen un papel ya sea como hormonas o como factores inhibidores o liberadores sobre otras hormonas.

En anfibios se han llevado a cabo estudios sobre el efecto que tienen las hormonas neurohipofisiarias en la neotenia. Se ha observado que la prolactina antagoniza los efectos de la tiroxina en la metamorfosis de muchos anfibios (Etkin y Gona, 1967; Gona y Gona, 1976; Bern y col., 1967). En el ajolote *Ambystoma tigrinum* los niveles de prolactina son más altos en su estado neoténico que en adultos no neoténicos o en larvas jóvenes (Norris y col., 1973). El bloqueo en la secreción de la prolactina en *A. tigrinum* acelera la metamorfosis artificialmente inducida por tiroxina (Platt, 1976). La oxitocina inhibe la acción de la prolactina y acelera la

metamorfosis artificialmente inducida (Platt y Licause, 1980). De lo anterior se puede inferir que las hormonas neurohipofisiarias tienen un efecto sobre la neotenia.

Para dilucidar una parte del papel que juegan los péptidos opioides en el *Ambystoma* nos proponemos hacer un estudio con la ayuda de técnicas histológicas e inmunohistoquímicas de la distribución anatómica de estas sustancias en la hipófisis en diferentes etapas de su desarrollo. La transformación al estado adulto se puede inducir artificialmente, provocando la metamorfosis. Esto nos permite estudiar la distribución de estos péptidos antes, durante y después de la metamorfosis. Ya que esta transformación no solamente abarca el paso del estado larvario al estado adulto, sino también es un cambio del medio ambiente acuático al medio ambiente terrestre, presupone cambios importantes en estas estructuras.

OBJETIVOS Y METAS

EL objetivo de esta tesis fue realizar, mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, un estudio ontogenético de la distribución anatómica de péptidos opioides en la hipófisis del axolotl *Ambystoma mexicanum* y *Ambystoma tigrinum*. Los péptidos opioides estudiados fueron: Leu-encefalina (LE), Met-encefalina (ME), Met-encefalina Arg-Gli-Leu (MERGL), B-endorfina (BE), dinorfina 1-8 (Din 1-8), dinorfina A (Din A) y dinorfina B (Din B), así también las características morfológicas de las células que los contienen. Este estudio se llevó a cabo en el animal adulto neoténico, es decir, en el estado larvario con madurez sexual, y durante diferentes etapas de la metamorfosis inducida experimentalmente mediante la

administración de tetrayodotironina (T4), así como en el estado adulto o de salamandra.

Metas:

1. Caracterizar en etapas el proceso de metamorfosis, para encontrar posibles diferencias entre etapas, en la distribución de los péptidos opioides.

2. Establecer la distribución anatómica de los péptidos opioides en la hipófisis del *Ambystoma mexicanum* en el estado de adulto neoténico.

3. Establecer la distribución anatómica de los péptidos opioides en la hipófisis del *Ambystoma mexicanum* durante las subsecuentes etapas de la metamorfosis hasta el estado adulto o de salamandra.

4. Determinar las relaciones anatómicas que existen entre los péptidos opioides, en las diferentes regiones de la hipófisis como su posible coexistencia dentro de la misma célula.

5. Correlacionar el posible papel fisiológico que tienen los péptidos opioides con base en su distribución anatómica y en los cambios que se presentan durante su desarrollo.

6. Comparar la distribución anatómica de los péptidos opioides en la hipófisis del *Ambystoma mexicanum* en las diferentes etapas de su desarrollo con la distribución de estos péptidos en otras especies de la escala filogenética.

7. Con todo lo anterior, contribuir al conocimiento de los péptidos opioides, tanto en su filogenia y ontogenia como en sus relaciones anatómicas y funcionales.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ajolotes *Ambystoma mexicanum* y *Ambystoma tigrinum*. Hembras y machos. Los *A. mexicanum* se obtuvieron del Lago de Xochimilco y los *A. tigrinum* de la Laguna del Carmen en Tlaxcala o de Perote Puebla. Todos los animales, tuvieron un periodo de adaptación al acuario de por lo menos una semana. Se mantuvieron en un cuarto con un ciclo de 10 horas de luz y 14 de obscuridad. Se colocaron en peceras cuyas dimensiones eran de 60 x 30 x 30 cm, a las que se les adaptaron filtros de cascada con carbón activado, un sistema de aireación y agua desclorinada. Se mantuvieron a una temperatura de entre 18 y 20°C. La alimentación fué a base de peces pequeños, pedazos pequeños de hígado de pollo, daphnias y artemia salina. Las salamandras se mantuvieron en cajas de acrílico transparente de 35 x 25 cm. con una playa de arena de 7 cm de altura y del otro lado agua declorinada con una altura de 5 cm.

Se realizaron los siguientes experimentos:

Experimento piloto de metamorfosis (#1).

Experimentos de metamorfosis para inmunohistoquímica (#2, #3).

Experimento de coexistencia (#4).

Experimento con antagonistas de los receptores opioides (#5).

Tinciones histológicas.

Experimento piloto de metamorfosis (#1).

Este experimento tuvo dos objetivos: 1. Determinar la dosis de T4 adecuada para lograr la metamorfosis en un tiempo en el que se pudieran distinguir los cambios morfológicos que suceden durante este proceso. 2. Escoger las estructuras anatómicas que sirvieron como

parámetros para diferenciar las etapas de la metamorfosis.

Para este grupo se utilizaron *A. tigrinum* (n=11) y *A. mexicanum* (n=7), con un promedio de peso de 57 g y una longitud de entre 17 y 23 cm. El día que se inició el experimento, se sacrificaron un *mexicanum* y un *tigrinum* (control testigo) para corroborar la distribución de los péptidos opioides en el adulto neoténico, descrita en antecedentes. Para ello se utilizó la técnica de inmunohistoquímica que se describe posteriormente,

Se formaron dos grupos de *A. tigrinum* de 5 animales cada uno. A el primer grupo se le manipuló (se pesaron y midieron) y a los del segundo grupo se les inyectó una dosis de 100 µg de tretrayodotironina (T4), (L-Tiroxina Pentahidratada Sigma t-2501), en 200 µl de solución salina intraperitoneal (i.p.). A los 6 *A. mexicanum* restantes se les inyectó T4 a diferentes dosis: 2 animales con 10 µg y 2 con 40 µg en 100 µl de solución salina i.p., y 2 con 100 µg en 200 µl i.p. Todos los animales se midieron y pesaron diariamente.

Las estructuras anatómicas que se midieron fueron: altura de la aleta dorsal, tomada verticalmente en la parte media de la aleta; altura de la aleta ventral, tomada también en la parte media de la aleta; altura de la cola, tomada verticalmente a la mitad de la longitud de la aleta ventral, incluyendo las alturas de las aletas ventral y dorsal en ese punto; para determinar la longitud de las branquias siempre se midieron la superior, media, e inferior del lado izquierdo. Estas medidas se hicieron la parte superior de las branquias hasta su unión con la cabeza. Se incluyeron también el peso corporal del animal, el cual se seca previamente para quitar el exceso de agua; la longitud total, tomada de la comisura bucal a la parte posterior de la cola; longitud cola-cloaca, medida desde donde termina la cloaca a la parte posterior de la cola; perímetro de la cintura, medida en círculo sobre el abdomen en la parte media entre las extremidades; ancho

de la cabeza, tomado con un vernier rostralmente al inicio de la branquia superior; y distancia entre los ojos, distancia entre las comisuras internas de los ojos. (Fig. 4).

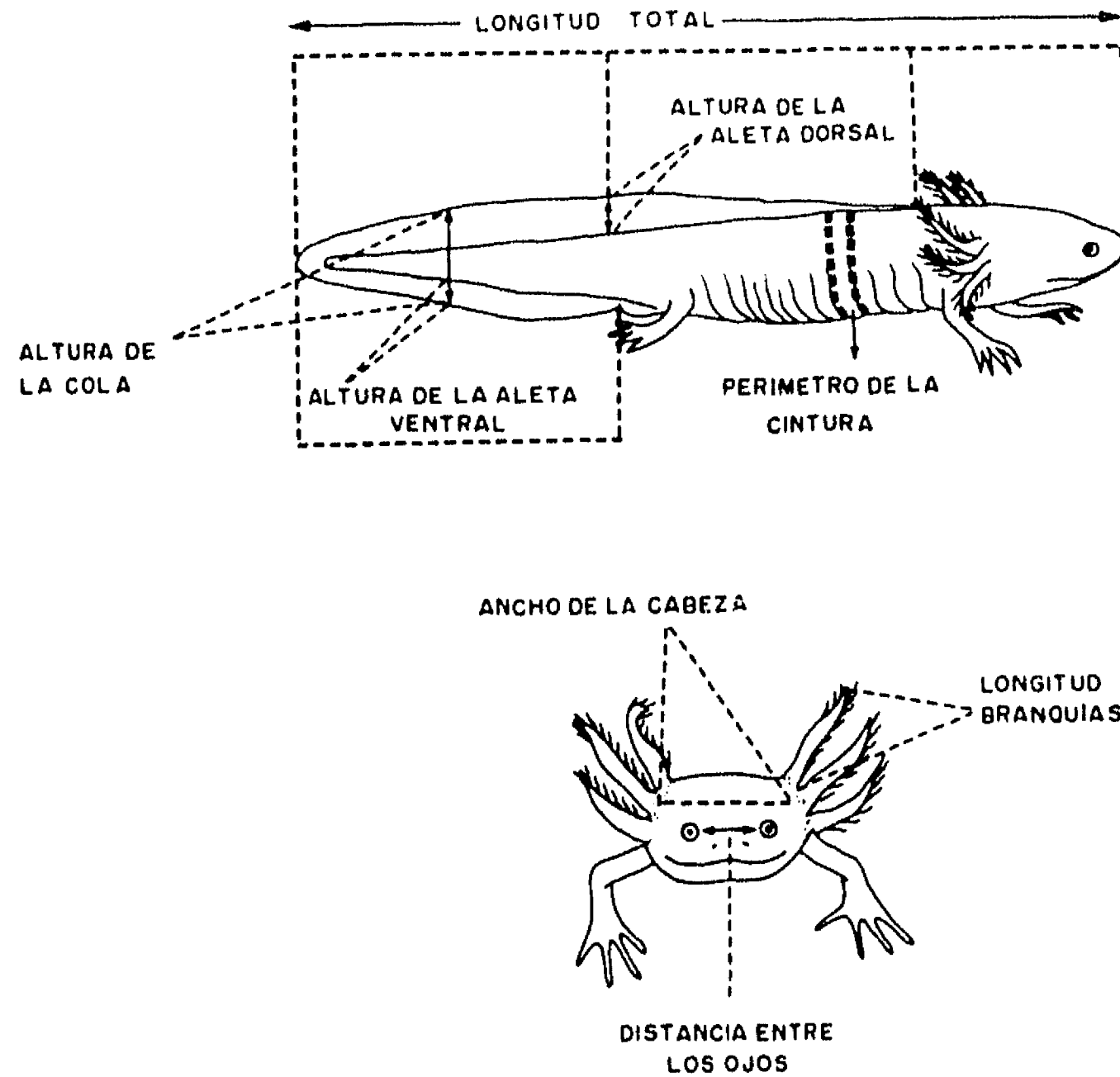


Figura 4. Sitios anatómicos y puntos de medición en donde se registraron los cambios durante las distintas etapas de la metamorfosis (ver texto).

De los resultados obtenidos de este primer experimento se escogieron los parámetros que consideramos como los mejores indicadores de la metamorfosis. Estos, son los que se cuantificaron y sirvieron para determinar las diferentes etapas de la metamorfosis, y fueron los siguientes: regresión de la aleta ventral, la regresión de la aleta dorsal, la reabsorción de la

branquia superior y la pérdida de peso corporal.

La dosis de T4 que resultó ser la más adecuada para producir la metamorfosis fué la de 100µg, que equivaló a ≈ 2.5 µg de T4, por gramo de peso y fué la que se utilizó en los experimentos siguientes.

Experimentos de metamorfosis para inmunohistoquímica (#2 y #3):

Los experimentos siguientes se llevaron a cabo de la manera que se expone a continuación:

Cada experimento estuvo compuesto por dos grupos de animales adultos neoténicos de uno y otro sexo.

Grupo I. Controles:

Control testigo: Animales no tratados, que se sacrificaron el día que se inició el experimento.

Control manipulado: Animales que únicamente se midieron y pesaron.

Control vehículo: Animales que fueron inyectados con 100 µl de solución salina (vehículo).

Grupo II. Experimentales:

Animales a los que se administró la T4 a dosis de 2.5 µg disueltos en 4 µl de sol. salina por cada gramo de peso de los axolotl. De estos animales se formaron 4 subgrupos:

Etapa I. Se sacrificaron cuando terminó la regresión de la aleta ventral (AV=0).

Etapa II. En el grupo de *A. tigrinum* se sacrificaron con AV=0 y AD=0. En el grupo de *A. mexicanum* se sacrificaron con AV=0 y cuando la regresión de la aleta dorsal fué de entre el 40 y 50 % y la reabsorción de las branquias fué de entre el 40 y 60 %, ya que, en este grupo la reabsorción de la aleta dorsal termina al mismo tiempo o un poco después de la reabsorción total

de las branquias.

Etapa III. Estos animales se sacrificaron cuando las branquias se reabsorbieron por completo, con la fusión de la abertura braquial, reabsorción total de la aleta dorsal y ventral, cambio en la posición de los ojos y la tendencia a mantener la cabeza fuera del agua.

Etapa IV. Este subgrupo fué de animales con morfología de adultos (salamandras), los cuales se sacrificaron 10 días o más, después de la etapa III (tabla III).

En el experimento 2, se utilizaron *A. tigrinum* (n=26) con un promedio de peso de 48.23g 2 para cada control y 20 experimentales.

El experimento 3, se llevó a cabo con *A. mexicanum* (n=34), 4 para cada uno de los controles y 22 experimentales. En este caso se utilizaron animales jóvenes (un año aprox.) con un promedio de peso 31.26 g.

Los animales de cada etapa se sometieron al procedimiento inmunohistoquímico para los péptidos opioides que se describe posteriormente.

Experimento de coexistencia (#4):

Para este experimento se utilizaron *A. mexicanum* (n=4); 2 adultos neoténicos y 2 salamandras con 10 días de postmetamorfosis (Etapa IV). En donde además de los anticuerpos para los péptidos opioides se utilizaron anticuerpos contra algunas hormonas hipofisarias como: ACTH, prolactina, hormona de crecimiento (GH) y el factor liberador de LH. Se realizaron experimentos de inmunohistoquímica de doble marcaje con el fin de ver si había coexistencia con alguna de estas hormonas y los péptidos opioides, y si estas hormonas tenían algún cambio en su distribución en la hipófisis de la salamandra.

Procedimiento Inmunohistoquímico:

Los animales se anestesiaron por inmersión (10 a 15 min) en 1000 ml de benzocaina (.02 %) en agua desclorinada. Se perfundieron por vía intra-cardíaca, primero con 100 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.4, y posteriormente con 300 ml de solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M pH 7.4. La disección del cerebro y la hipófisis se llevó a cabo por la parte dorsal de la cabeza. Se removió el cartilago craneal y se expuso el tejido cerebral, posteriormente se extrajo el cerebro y la hipófisis. Se postfijaron de 3 a 12 horas en la misma solución, después de la cual las piezas se equilibraron en concentraciones crecientes de sacarosa de 12%, 16% y 18%. Se mantuvieron hasta su procesamiento. Finalmente se incluyeron en un medio de montaje (Tissue Tek, Miles Lab.) para cortarse.

Corte y Montaje:

Para el proceso de corte el tejido se congeló rápidamente (-20 °C). Se realizaron cortes parasagittales de 15 µm de espesor, del cerebro y la hipófisis, con un crióstato a temperatura de -16 a -18 °C. Se montaron directamente en portaobjetos previamente gelatinados con una solución de gelatina-cromalúmina.

El montaje fué de la siguiente manera: se numeraron los portaobjetos, entre 20 y 24, y cada corte se montó en diferente portaobjetos, en forma consecutiva iniciando nuevamente con el primer portaobjetos hasta obtener 3 o 4 cortes en cada uno de los portaobjetos. De esta manera se obtuvieron cortes seriados en distintos portaobjetos que fueron incubados con diferentes anticuerpos y controles para que fueran comparados.

Metodo Indirecto de Inmunofluorescencia:

1. Se dejaron secar las laminillas por 30 minutos.
2. Se incubaron con un primer anticuerpo (Ac), en una camara húmeda a 4 °C por 24 h.
3. Se lavaron con PBS tritón (0.03 % Tritón X-100 en PBS).
4. Se incubaron con un segundo Ac. en una cámara húmeda a 37 °C por 2 h (IGg H+L hecho en cabra contra conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína o rodamina (Lab. ICN) a una dilución de 1:100.
5. Se lavó el tejido con PB.
6. Se montaron con glicerina.

En los experimentos de coexistencia, se repitió la técnica desde el paso 2 utilizando un anticuerpo diferente al primero. En la segunda incubación se utilizó un segundo anticuerpo conjugado a otro marcador fluorescente como el isotiocianato de fluoresceína, rodamina o el Texas red.

Se llevaron a cabo diferentes controles para determinar la especificidad de los anticuerpos en condiciones inmunohistoquímicas. Los controles fueron: a) omisión del anticuerpo primario, b) omisión del segundo anticuerpo, c) preadsorción del anticuerpo primario con un exceso (10^{-4} M) de su péptido sintético específico, d) control buffer (todo el experimento se corrió únicamente con PBS tritón para ver la fluorescencia nativa).

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

En los experimentos de coexistencia no se realizaron preadsorciones de los anticuerpos

antihormonas.

Antisueros:

Los antisueros anti- LE y ME y MERGL fueron elaborados en el Laboratorio de Analisis Químicos del IMP. En la tabla IV se resumen sus características de inmunorreactividad cruzada mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA).

Péptido	% de reactividad cruzada Anticuerpo		
	ME	LE	MERGL
Met-(o)-encefalina	100.00	<0.01	<0.01
Met-encefalina	2.90	3.83	<0.01
Leu-encefalina	0.01	100.00	<0.01
Met-encefalina-Arg	0.76	0.53	<0.01
Leu-encefalina-Arg	<0.01	4.33	<0.01
Met-encefalina-Arg-Fen	<0.01	0.37	<0.01
Met-encefalina-Arg-Gli-Leu	<0.01	<0.01	100.00
Dinorfina (1-8)	<0.01	<0.01	<0.01
α -Endorfina	<0.01	<0.01	<0.01
β -Endorfina	<0.01	<0.01	<0.01
γ -Endorfina	<0.01	<0.01	<0.01

Los anticuerpos fueron obtenidos usando el método de inmunización y caracterización descrito previamente (Vindrola y col., 1981). Los estándares fueron obtenidos de los Laboratorios Peninsula. Modificada de Asai y col. 1995.

El anticuerpo de prolactina fué desarrollado en conejo en el laboratorio de la Dra. Clapp, tiene una DM50 de 12 ng (RIA), y es 10 veces más específico para la prolactina 23 K que para el fragmento amino terminal 16 Kd. Los demás anticuerpos y los péptidos utilizados fueron de marcas comerciales (ICN y Peninsula Labs.) con características de especificidad y afinidad controladas.

Para determinar la dilución óptima de trabajo 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. En la tabla V se muestran los péptidos sintéticos, los anticuerpos las diluciones utilizadas.

TABLA V		
DILUCIONES DE LOS ANTICUERPOS Y PEPTIDOS UTILIZADOS		
Péptidos sintéticos	Anticuerpos	Dilución
Leu-encefalina	Anti-Leu-encefalina	1:100
Met-encefalina	Anti-Met-encefalina	1:100
Met-encefalina-Arg-Gly-Leu	Anti-Met-encefalina-Arg-Gly-Leu	1:200
Dinorfina (1-8)	Anti-Dinorfina A (1-8)	1:50
Dinorfina A (1-17)	Anti-Dinorfina A (1-17)	1:50
Dinorfina B (Rimorfina)	Anti-Dinorfina B	1:50
Beta-endorfina	Anti- Beta-endorfina	1:100
	Anti-ACTH	1:50
	Anti-PRL	1:100
	Anti-GH	1:50
	Anti-LHRH	1:50
	Anticuerpo IgG (H+L) hecho en cabra contra conejo y conjugado a isotiocianato de fluoresceína o de rodamina.	1:100

Tinciones histológicas.

Con el objeto de conocer y comparar la morfología de las diferentes células de los lóbulos hipofisarios y su distribución se realizaron diferentes tinciones: Nissl, Hematoxilina-eosina (H-E), y la tinción de Kikui y Miki (1995), modificada de Heidenhain. Las células se clasifican en cromóforas y cromófilas (acidófilas y basófilas) dependiendo de la afinidad que tengan por los colorantes y que se correlaciona al tipo de hormona que sintetiza. Se utilizaron *A. mexicanum* ($n=4$) adultos neoténicos y una salamandra los cuales previa anestesia por inmersión en la solución de benzocaina (2%), se fijaron por perfusión intracardíaca, con los fijadores

recomendados para cada una de las técnicas. Se incluyeron en parafina, excepto los que se tiñeron con la técnica de Nissl que se cortaron por congelación. Se hicieron cortes longitudinales seriados de 6 μm de espesor.

Experimento con antagonistas de los receptores opioides (#5):

Este experimento se llevó a cabo en un grupo de *A. mexicanum* ($n=16$) con un peso promedio de 65.21g. Tuvo por objeto determinar el papel que juegan los péptidos opioides sobre la neotenia. Se utilizaron antagonistas de los receptores opioides como son: La Naltrexona que es un antagonista no específico pero con un efecto principalmente μ (Zukin y col., 1982); el Naltrindol que es un antagonista no peptídico altamente selectivo a los receptores δ , y se puede administrar periféricamente (Portoghese y col., 1988) y la Nor-Binaltorfimida, antagonista κ altamente selectivo (Portoghese y col., 1987). Las dosis utilizadas para cada antagonista fueron de 0.1, 10 y 30 μM , para cada uno. Se aplicaron inyecciones diárias (30 μl) en la cavidad craneal en medio de la porción rostral de los lóbulos olfatorios con una jeringa Hamilton. Se utilizaron 3 animales para cada antagonista, uno para cada dosis. Los controles fueron: dos animales inyectados con solución salina y dos que fueron inyectados con T4 2.5 μg por g. Además tres animales se les aplicó un agonista κ , el U50-488 (Lahiti y col., 1982), a las mismas dosis antes mencionadas. Todos los animales se midieron y pesaron cada tercer día y se llevó un registro de las mediciones como en los experimentos anteriores. En estos animales no se siguió el procedimiento de inmunohistoquímica.

Analisis de los resultados

La observación se llevó a cabo en un microscopio Leitz, con una lámpara de vapor de mercurio de 50 W y bloque de filtros I-2 que tiene un rango de excitación u.v. azul, un filtro excitador entre la banda 450 a 490 μm para el isotiocianato de fluoresceína y para el de rodamina un bloque de filtros N-2 con un rango de excitación u. v. verde, un filtro excitador en la banda 530-560 μm . Se tomaron fotomicrografías con el dispositivo para fotografías del microscopio y una cámara Leitz de 35 mm. Se utilizaron películas Ektachrome 400 y Ektar 25 para las fotomicrografías en color y T MAX 100 y 400 ASA y Tri X pan 400 ASA para blanco y negro con película. Se realizaron análisis cualitativos, topológicos y comparativos de la inmunorreactividad encontrada en la hipófisis de los diferentes grupos de animales.

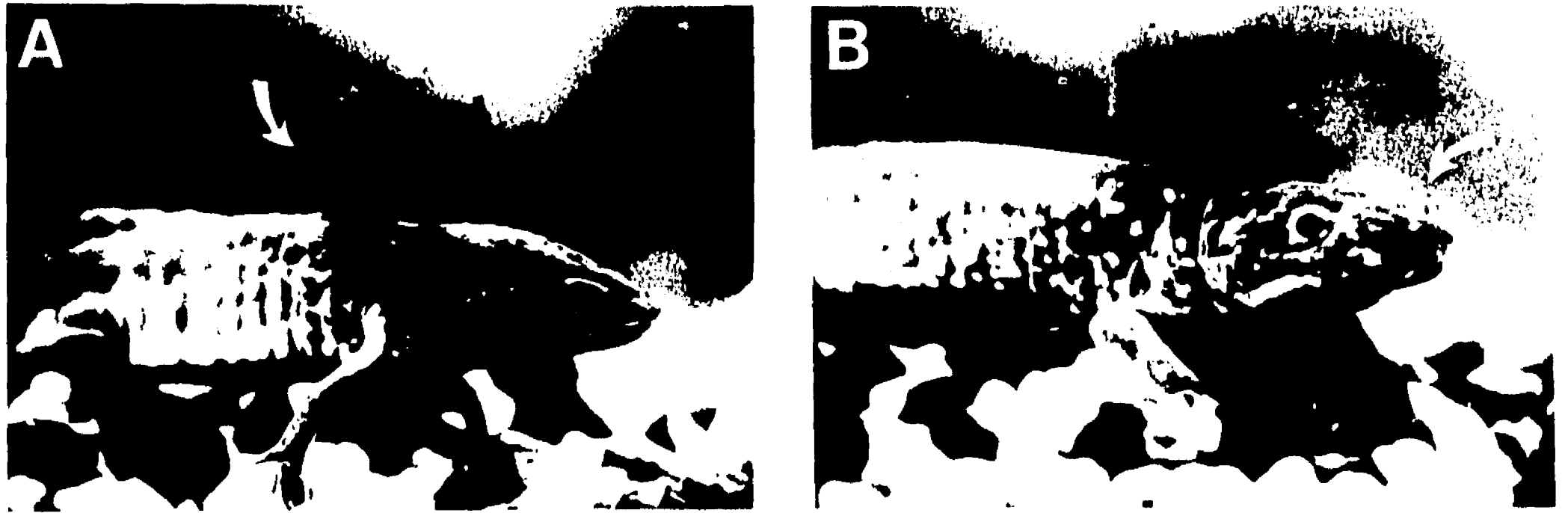


Figura 5. Fotografías del Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). **A.** Adulto neoténico, que presenta las características de la larva como es la presencia de las branquias (↑). **B.** La salamandra. Nótese la pérdida de las branquias y la presencia de los párpados (↑).

RESULTADOS

La primera parte de los resultados se refiere a los cambios anatómicos que presentaron los distintos grupos de ajolotes durante la metamorfosis. En la segunda parte se muestran los cambios en la distribución de la inmunorreactividad a los péptidos opioides en cada una de las etapas de la metamorfosis.

Experimento 1, Piloto.

El experimento piloto estuvo formado por tres grupos de ajolotes: *A. mexicanum* (*A. mex.*) inducido con la administración de T4 (n=6), *A. tigrinum* con metamorfosis espontánea (*A. t. esp*) (n=5) y *A. tigrinum* con metamorfosis inducida con la administración de T4 (*A. t. ind*) (n=5). Los ajolotes del grupo *A. mex.* inducidos con las dosis de 10 y 40 µg de T4, no presentaron el proceso de metamorfosis hasta el día 36 después de la inyección de T4, por lo que para los experimentos siguientes se utilizó la dosis de 100 µg que en estos animales equivalió a ≈2.5 µg por g de peso. El grupo que llamamos de metamorfosis espontánea fue el grupo manipulado (medido y pesado) que presentó el proceso de metamorfosis espontáneamente. En este grupo uno de los ajolotes no presentó metamorfosis y uno más murió después de la reabsorción de la aleta ventral.

En la tabla VI se muestran los días promedio que tardan en reabsorberse las aletas ventrales, las dorsales y las branquias, en los distintos grupos de animales del experimento piloto. Se muestra también el peso promedio que tuvieron los animales el día en que se inició el experimento (Pi) y el peso en la etapa III (PF).

En las figuras 6, 7 y 8, se muestra los días que tardan en reabsorberse las diferentes estructuras anatómicas y su comparación entre los diferentes grupos (Fig. 6, 7 y 8).

En las figuras 9, 10 y 11, se graficaron los porcentajes de la longitud de las estructuras anatómicas medidas a través del tiempo hasta su reabsorción total, para cada grupo. En la figura 12 se graficaron los pesos promedio de los diferentes grupos hasta llegar a la etapa III (reabsorción total de aletas y branquias). La figura 13 muestra la diferencia del promedio de los pesos iniciales y finales de cada grupo.

TABLA VI.

Experimento #1, Piloto:

	<i>A. mex.</i> (n=2)	<i>A. t. esp.</i> (n=5)	<i>A. t. ind.</i> (n=5)
AVo=	11 días	13.25 días	8.8 días
ADo=	26.5 días	25.33 días	15.6 días
ABo=	28 días	26.33 días	16 días
Pi=	53.85 g	71.75 g	48.94 g
Pf =	35.6 g	48.43 g	35.94 g

En esta tabla se muestra los días promedio que tardan en reabsorberse las estructuras anatómicas de los distintos grupos de animales en el experimento piloto: la aleta ventral (AVo), etapa II; la aleta dorsal (ADo), y cuando el animal tiene reabsorción total de aletas y branquias (ABo) que consideramos como etapa III. Se muestra también el peso promedio inicial del grupo (Pi) y el peso final (Pf), tomado el día que presenta ABo, o sea, la metamorfosis total.

El experimento piloto mostró que los parámetros anatómicos más adecuados para determinar las diferentes etapas de la metamorfosis fueron: la regresión de la aleta dorsal, regresión de la aleta ventral, la reabsorción de la branquia superior y la pérdida de peso corporal. Además, en los primeros experimentos se midieron: el ancho total de la aleta, la cual disminuye en relación a la reabsorción de la aleta ventral y dorsal; la longitud de las branquias superior, media, e inferior izquierdas, las cuales se reabsorben al mismo tiempo, por lo que se tomó en cuenta únicamente la medida de la branquia superior; la longitud total no se modifica al igual que la longitud cola-cloaca; el perímetro de la cintura está en relación con la ingesta de

Etapa I Grupo Piloto
Aleta ventral = 0

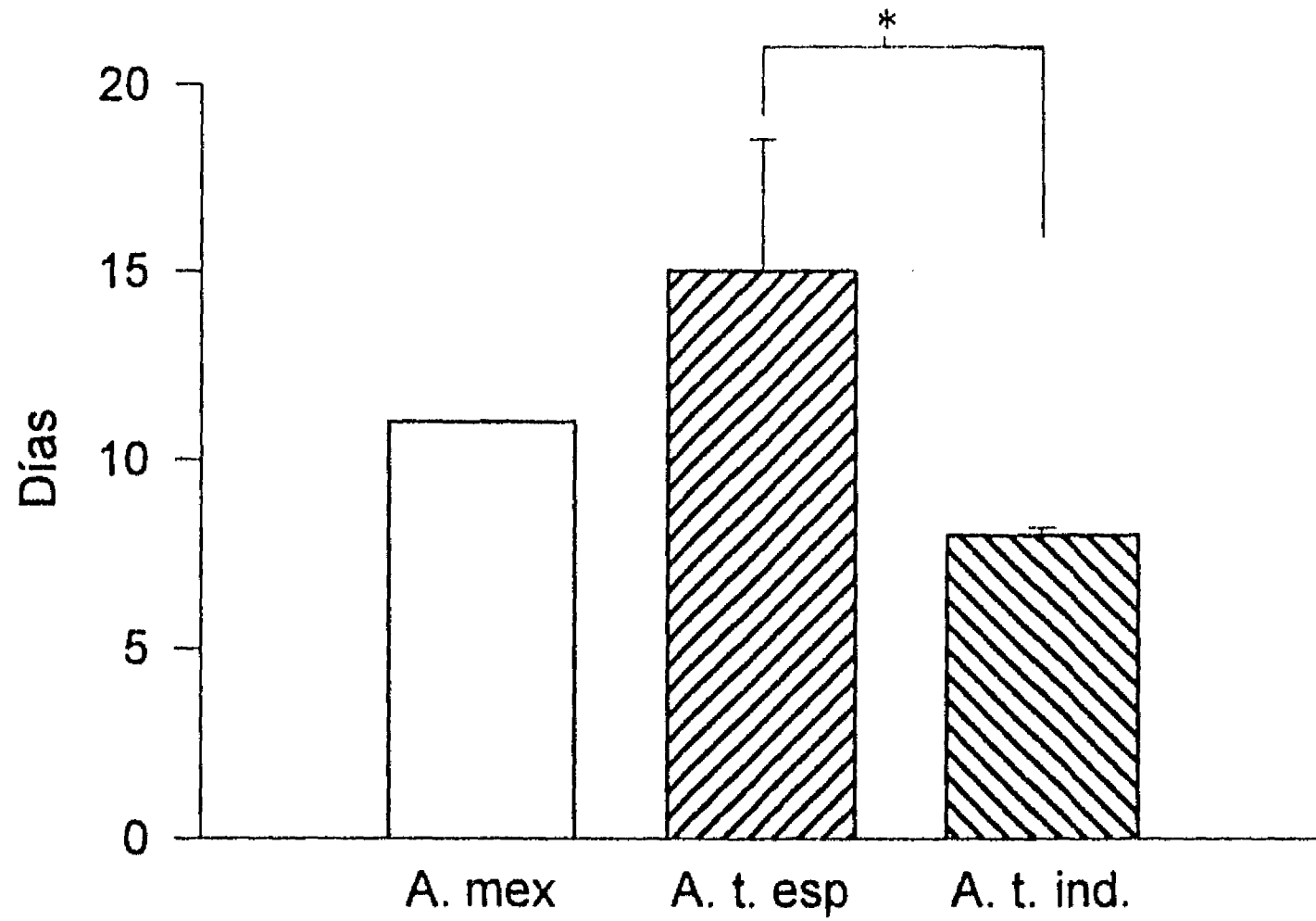


Figura 6. La gráfica muestra los días (x) que toma el proceso de reabsorción total de la aleta ventral. El análisis de varianza (ANOVA) mostró una diferencia significativa (*) únicamente entre el grupo de *A. tigrinum* con metamorfosis espontánea (n=5) y el *A. tigrinum* con metamorfosis inducida (n=5). $p \leq 0.05$. Abreviaciones: *A. mexicanum*, *A. mex.*; *A. tigrinum* con metamorfosis espontánea, *A. t. esp.*; *A. tigrinum* con metamorfosis inducida, *A. t. ind.*.

Grupo Piloto
Aleta dorsal = 0

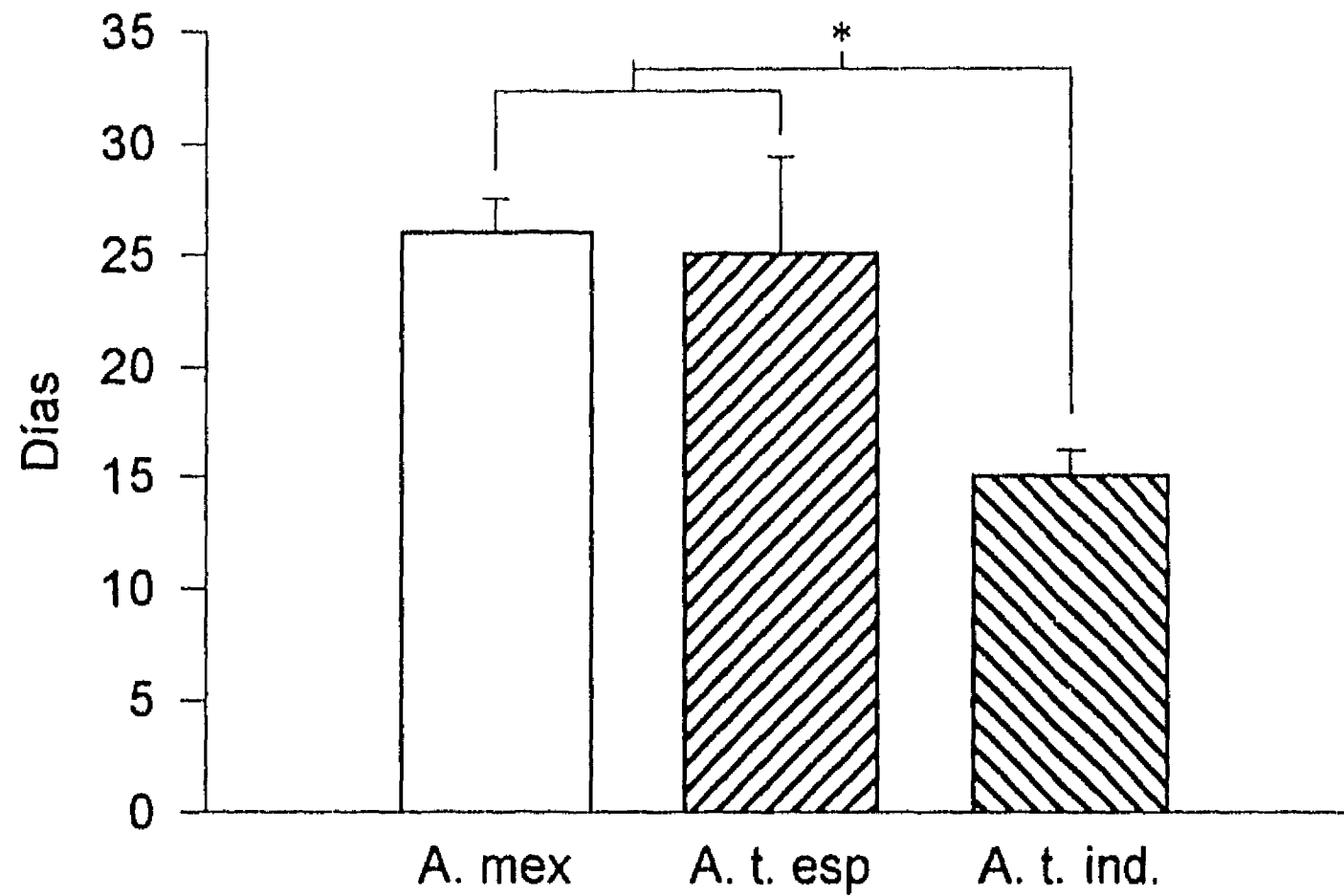


Figura 7. La gráfica muestra los días (x) que toma el proceso de reabsorción total de la aleta dorsal. El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas (*) entre el grupo *A. mex* y el *A. t. ind.*, y entre el *A. t. esp* y el *A. t. ind.*. $p \leq 0.05$. Abreviaciones: *A. mexicanum*, *A. mex.*; *A. tigrinum* con metamorfosis espontánea, *A. t. esp.*; *A. tigrinum* con metamorfosis inducida, *A. t. ind.*

Etapa III Grupo Piloto Aletas y branquias = 0

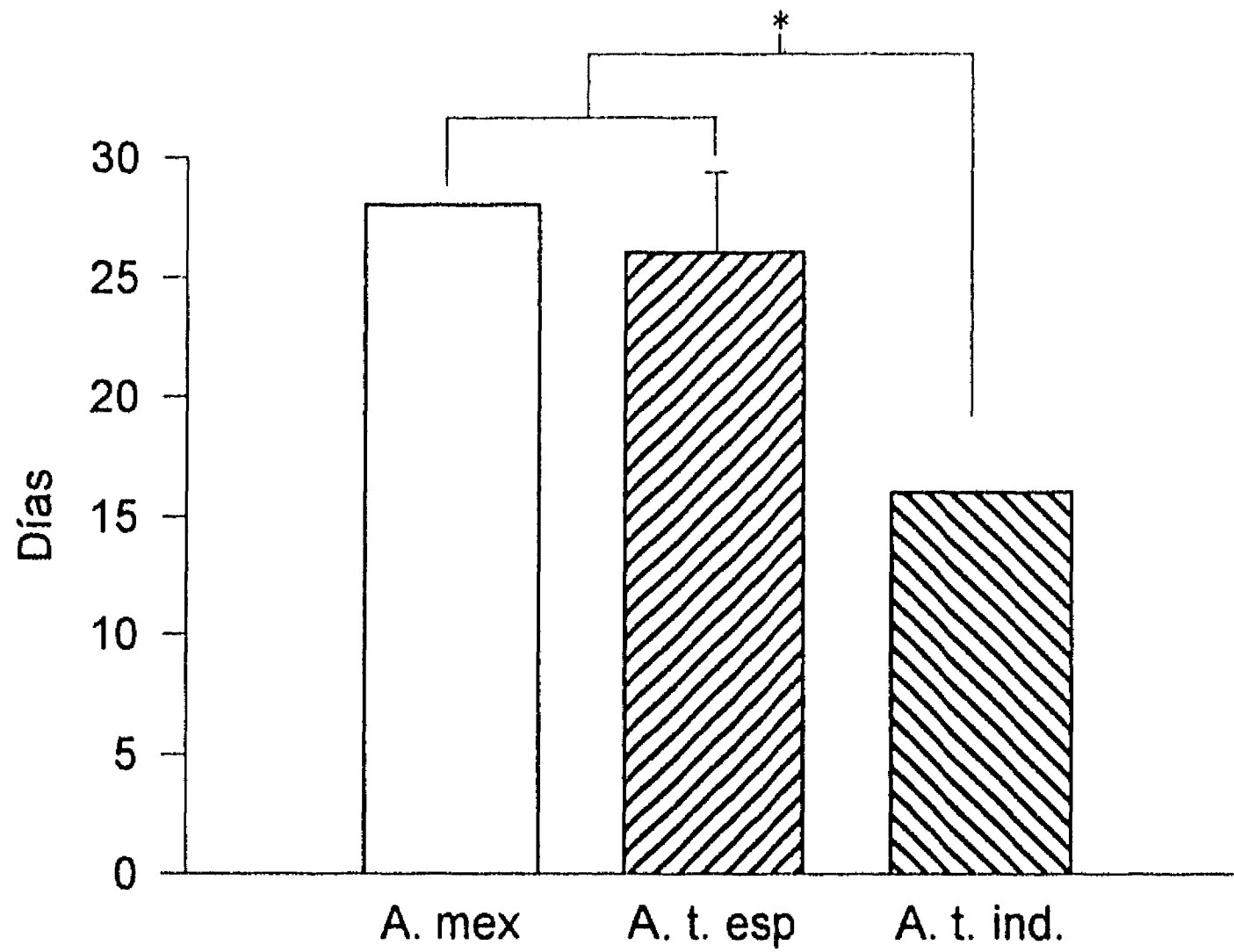


Figura 8. La gráfica muestra los días (x) que toma el proceso de reabsorción total de aletas (ventrales y dorsales) y branquias, es decir, la metamorfosis total. El análisis de varianza (ANOVA) mostró una diferencia significativa (*) entre el grupo *A. t. ind.* y los grupos *A. mex.* y *A. t. esp.* $p \leq 0.05$. Abreviaciones: *A. mexicanum*, *A. mex.*; *A. tigrinum* con metamorfosis espontánea, *A. t. esp.*; *A. tigrinum* con metamorfosis inducida, *A. t. ind.*

Aleta Ventral Grupo Piloto

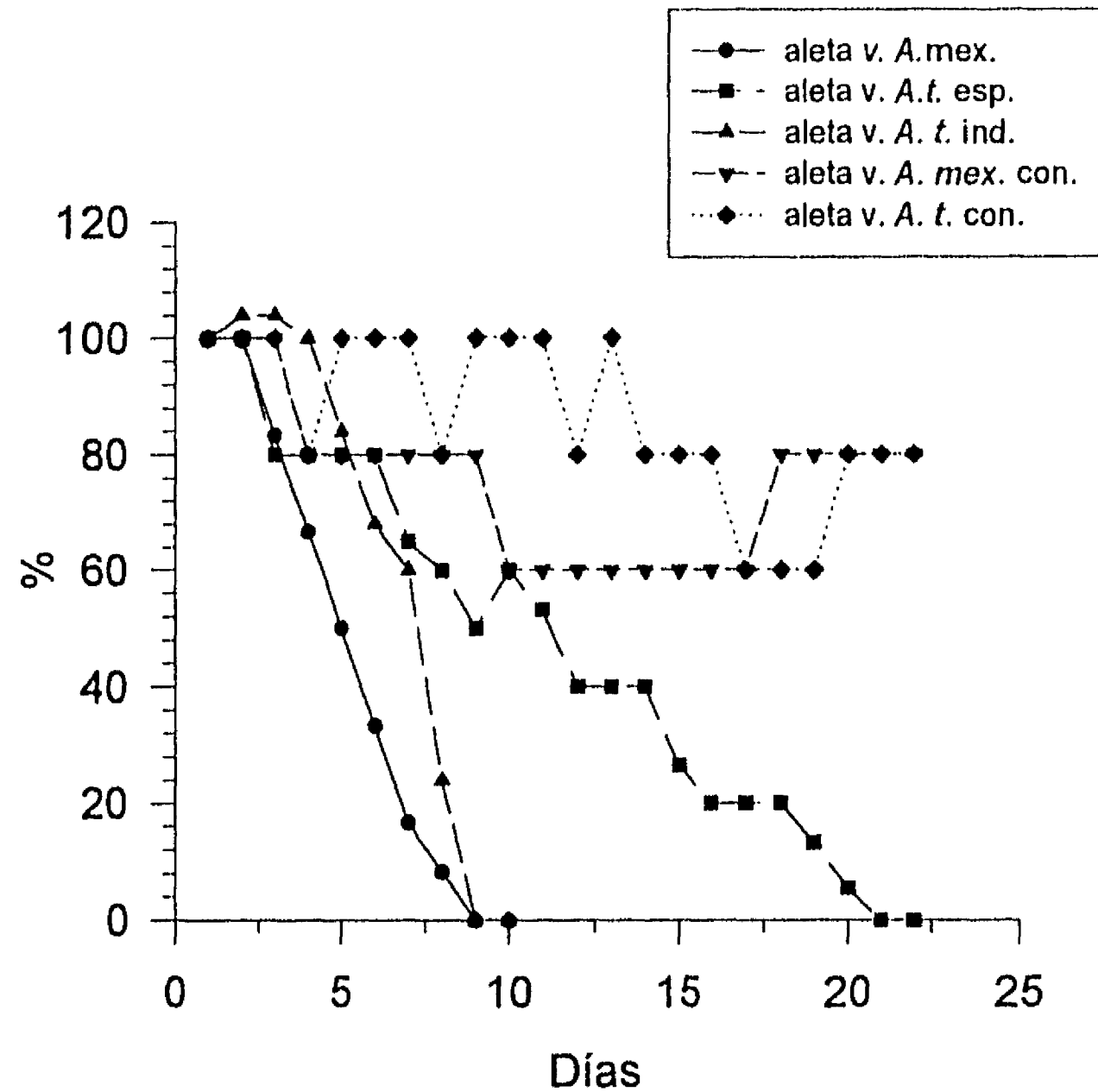


Figura 9. Gráfica del porcentaje de la longitud promedio de las aletas ventrales hasta llegar a la etapa III, para cada uno de los grupos *A. mex.*, *A. t. esp.* y *A. t. ind.* Además se graficaron un animal del grupo de los *A. t.* espontáneo y uno del *A. mex.* inducido con una dosis de 10 μg de T4 que no presentaron el proceso de metamorfosis (*A. t. con.* y *A. mex. con.*). Nótese que estos dos últimos no presentaron la reabsorción total de la aleta ventral. No se graficaron los errores estándar por claridad. Abreviaciones: *A. mexicanum*, *A. mex.*; *A. tigrinum* con metamorfosis espontánea, *A. t. esp.*; *A. tigrinum* con metamorfosis inducida, *A. t. ind.*

Aleta Dorsal Grupo Piloto

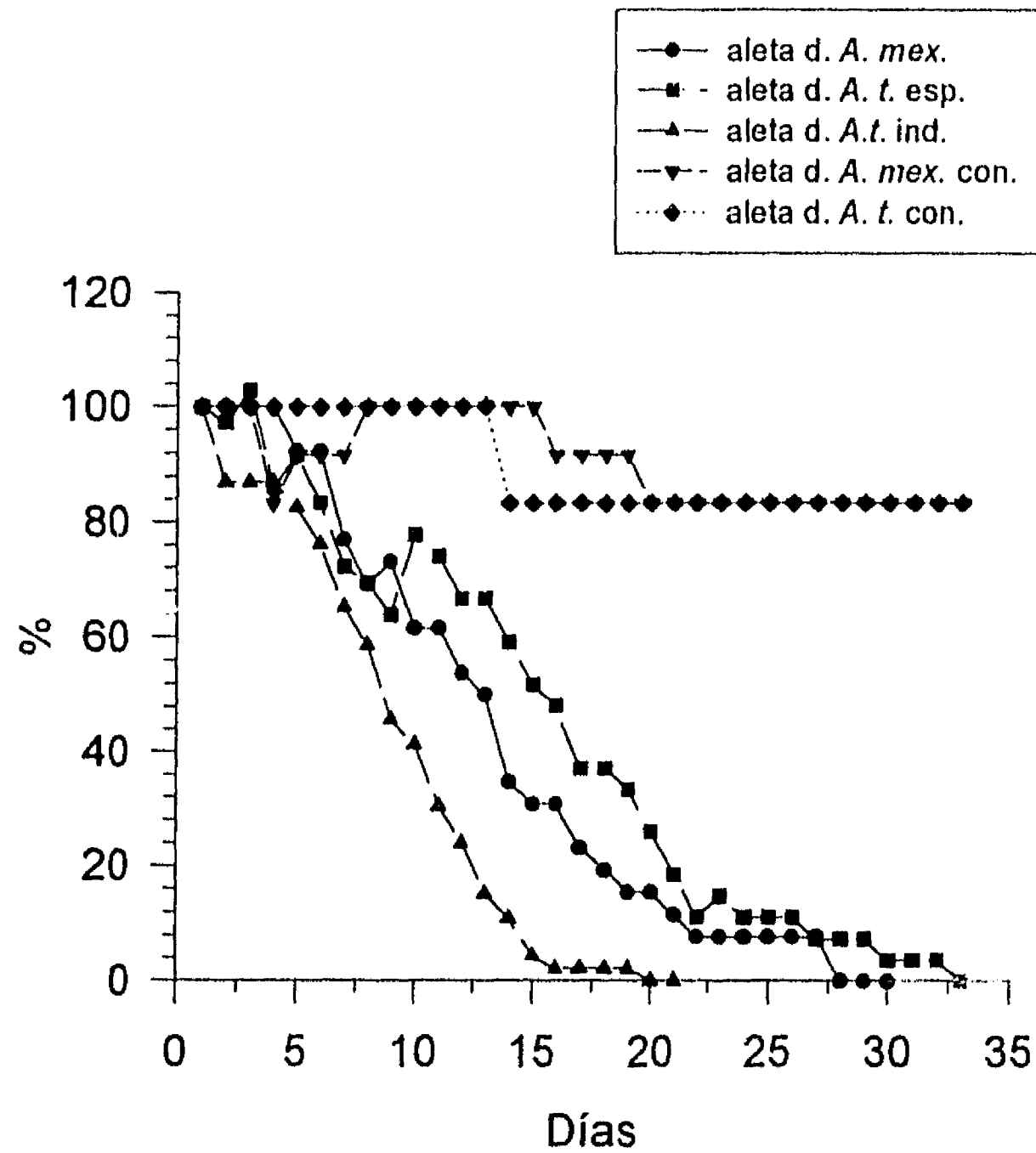


Figura 10. Gráfica del porcentaje de la longitud promedio de las aletas dorsales hasta llegar a la etapa III de cada uno de los grupos *A. mex.*, *A. t. esp.* y *A. t. ind.* Además se graficaron un animal del grupo de los *A. t.* espontáneo y uno del *A. mex.* inducido con una dosis de 10 μg de T4 que no presentaron el proceso de metamorfosis (*A. t. con.* y *A. mex. con.*). No se graficaron los errores estándar, por claridad. Abreviaciones: *A. mexicanum*, *A. mex.*; *A. tigrinum* con metamorfosis espontánea, *A. t. esp.*; *A. tigrinum* con metamorfosis inducida, *A. t. ind.*

Branquia Grupo Piloto

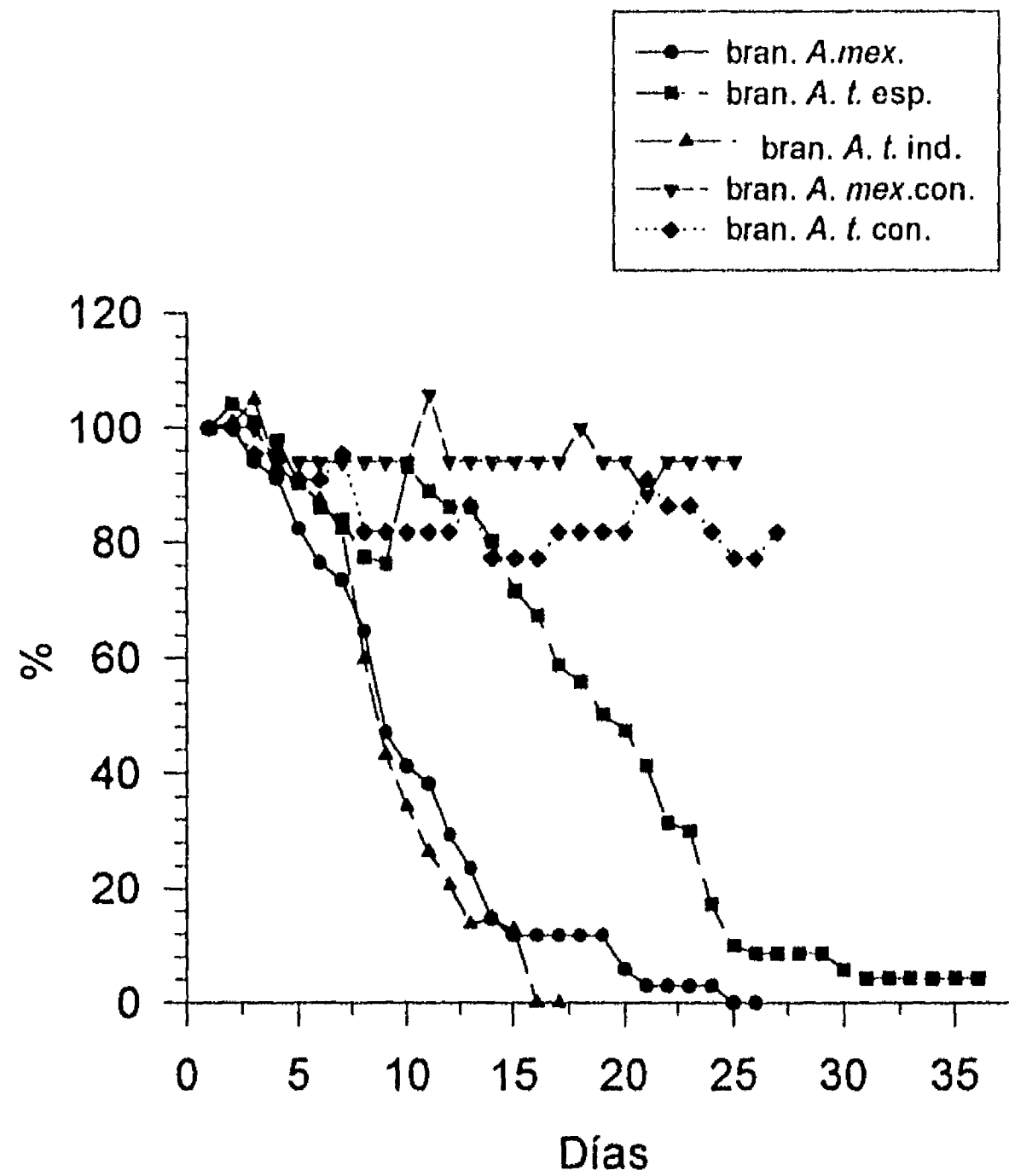


Figura 11. Gráfica del porcentaje de la longitud promedio de las branquias superiores hasta la etapa III, para cada grupo *A. mex.*, *A. t. esp.* y *A. t. ind.* Además se graficaron un animal del grupo de los *A. t.* espontáneo y uno del *A. mex.* inducido con una dosis de 10 μg de T4 que no presentaron el proceso de metamorfosis (*A. t. con.* y *A. mex. con.*). No se graficaron los errores estándar por claridad. Abreviaciones: *A. mexicanum*, *A. mex.*; *A. tigrinum* con metamorfosis espontánea, *A. t. esp.*; *A. tigrinum* con metamorfosis inducida, *A. t. ind.*

Peso Grupo Piloto

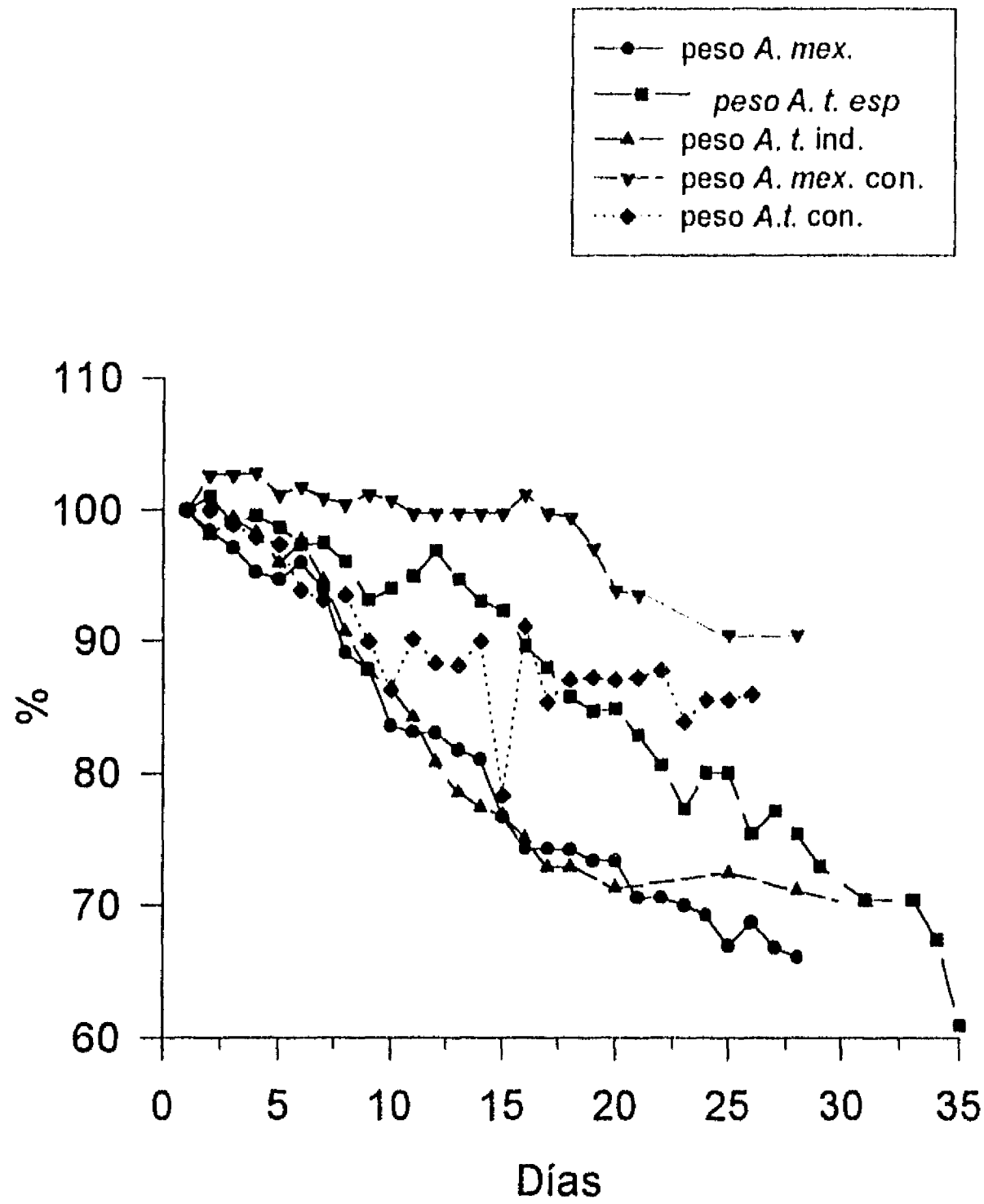


Figura 12. Gráfica del porcentaje del peso promedio hasta llegar a la etapa III de cada uno de los grupos *A. mex.*, *A. t. esp.* y *A. t. ind.* Además se graficaron un animal del grupo de los *A. t.* espontáneo y uno del *A. mex.* inducido con una dosis de 10 μg de T4 que no presentaron el proceso de metamorfosis (*A. t. con.* y *A. mex. con.*). No se graficaron los errores estándar por claridad. Abreviaciones: *A. mexicanum*, *A. mex.*; *A. tigrinum* con metamorfosis espontánea, *A. t. esp.*; *A. tigrinum* con metamorfosis inducida, *A. t. ind.*

Grupo Piloto peso

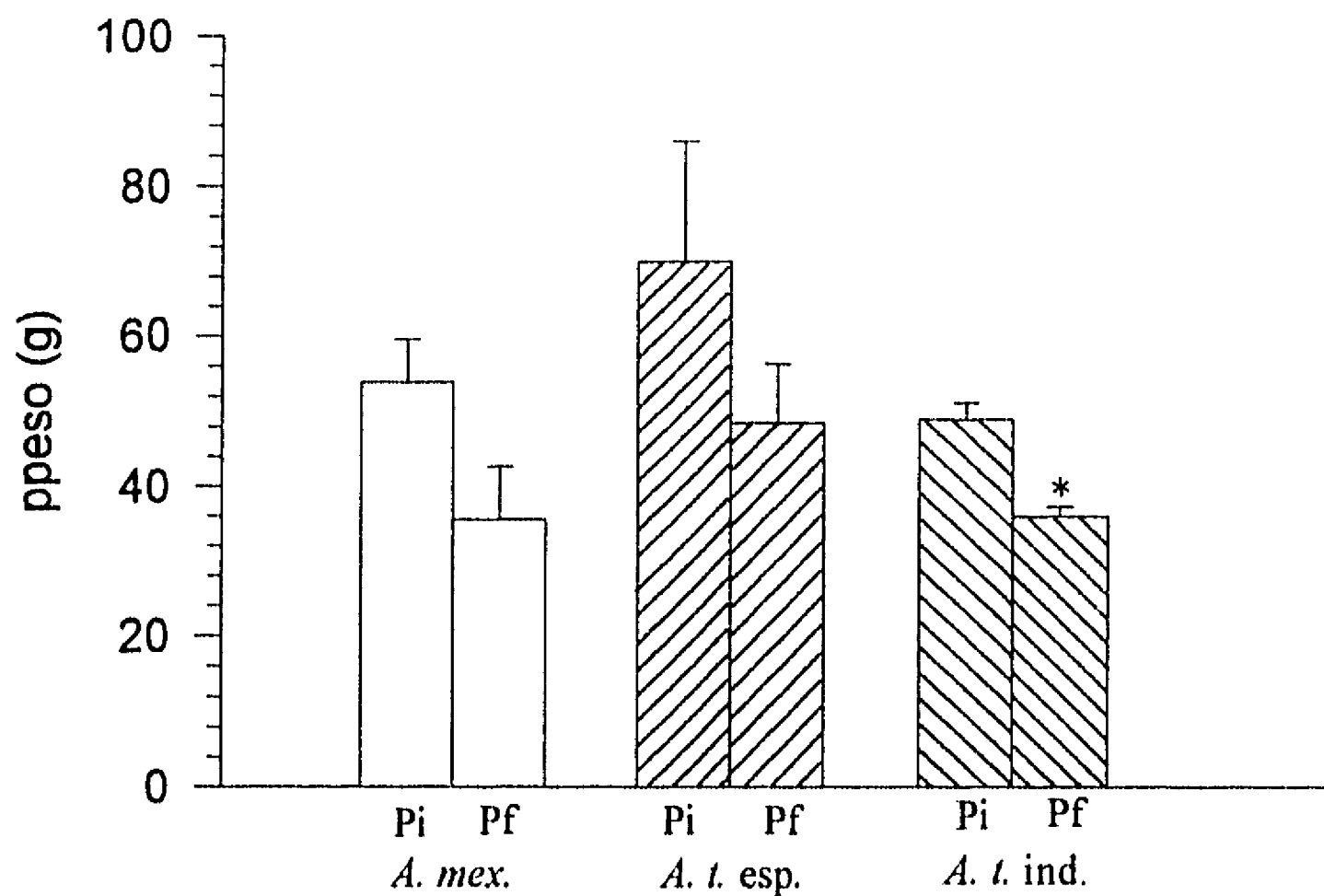


Figura 13. Esta gráfica muestra los pesos iniciales (Pi) y los pesos finales (Pf) en los tres grupos: *A. mex.*, *A. t. esp.* y *A. t. ind.*, que presentaron los animales en el proceso de metamorfosis hasta la etapa III. El grupo *A. t. ind.* tuvo una diferencia significativa $p=0.018$ (*) para la t pareada entre el peso inicial y el peso final. $p \leq 0.05$. Abreviaciones: *A. mexicanum*, *A. mex.*; *A. tigrinum* con metamorfosis espontánea, *A. t. esp.*; *A. tigrinum* con metamorfosis inducida, *A. t. ind.*

alimentos, por lo que no se consideró como parámetro de la metamorfosis; el ancho de la cabeza y la distancia entre los ojos, disminuyeron significativamente, pero no se consideraron por presentar dificultad para la medición, lo que causó un gran estrés al animal además de un mayor tiempo de manipulación (Fig. 4).

A partir de las mediciones anteriores se dividió la metamorfosis en cuatro etapas descritas previamente en material y método y que se resumen en la tabla VII.

Tabla VII.	
Etapas de la metamorfosis.	
Etapa I.	Cuando la reabsorción de la aleta ventral es total (AV=0).
Etapa II.	En el grupo de <i>A. tigrinum</i> la aleta dorsal llega a 0 antes de que las branquias se reabsorban completamente, por lo tanto, esta etapa es cuando tiene reabsorción total de la aleta ventral y reabsorción total de la aleta dorsal (AV=0 y AD=0). En el grupo de <i>A. mexicanum</i> la reabsorción de la aleta dorsal en algunos animales termina al mismo tiempo o un poco después de la reabsorción total de las branquias, por lo que los parámetros fueron AV=0 y reabsorción de la aleta dorsal de entre el 40 y 50 % ; la reabsorción de las branquias fué de entre el 40 y 60 %.
Etapa III.	Se caracterizó por presentar reabsorción total de las aletas dorsal y ventral, de las branquias; la fusión de la abertura braquial; cambio en la posición de los ojos, y la tendencia a mantener la cabeza fuera del agua.
Etapa IV.	Esta etapa se caracterizó por que los animales presentaban el fenotipo de adulto, es decir, salamandras, las cuales se sacrificaron 10 días o más, después de la etapa III.

Experimento #2

En este experimento se utilizó un grupo de *A. tigrinum* (n=26). De este grupo inicial los controles testigo (n=2) fueron sacrificados el primer día del experimento; los controles manipulado (n=2) y vehículo (n=2) iniciaron el proceso de metamorfosis siguiendo los mismos parámetros de la metamorfosis espontánea hasta convertirse en salamandras. De los 20 inducidos

con T4, se obtuvieron cinco para la etapa I; cuatro para la etapa II; dos para la etapa III, y tres para la etapa IV. Se tuvo una mortalidad del 23 % (6 de 26). En la tabla VIII se muestran las características de los animales sacrificados en las diferentes etapas de la metamorfosis para el grupo de *A. tigrinum*.

Tabla VIII.

Experimento #2, grupo *A. tigrinum*.

	Etapa I (n=5)	Etapa II (n=4)	Etapa III (n=2)	Etapa IV (n=3)	(x) grupo (n = 1 4)
AVo=	8.2 días	8.25 días	10.25 días	9.75 días	9.11 días
ADo=	32.62 %	12.5 días	16.75 días	17.5 días	15.58 días (n=9)
ABo=	35.16 %	14.81 %	17.5 días	18 días	17.75 días (n=5)
Pi=	44.93 g	45.07 g	50.07 g	53.6 g	48.23 g
Pf =	38.83 g	36.15 g	37.47 g	31.67	21.92 g (n=2)

En la tabla se muestran las características de los animales sacrificados en las diferentes etapas de la metamorfosis para el grupo de *A. tigrinum*. En la etapa I no se ha llegado a ADo ni a ABo, por lo que se pone el % de la longitud de las estructuras en ese momento, lo mismo sucede con ABo en la etapa II. El peso inicial corresponde al peso que tenían al empezar el experimento. El peso final corresponde al peso de los animales el día que fueron sacrificados. En la columna de promedios (x), se descuentan los animales que se sacrificaron en cada etapa.

Experimento # 3.

Se utilizaron *A. mexicanum* (n=28), dos para cada control y 22 experimentales (inducidos con T4). Los controles testigo (n=2) se sacrificaron y se realizaron los experimentos de inmunohistoquímica cuyos resultados se describen posteriormente. Los controles vehículo (n=2)

y manipulado (n=2) no presentaron el proceso de metamorfosis y se sacrificaron uno de cada control el día 15 postinyección y otro el día que se perfundieron los animales del grupo III para inmunohistoquímica. De los 22 inducidos con T4, cuatro no presentaron el proceso de metamorfosis (18 %). Por lo que se obtuvieron: cinco para la etapa I; cinco para la etapa II, cuatro para la etapa III y dos para la etapa IV. Con una mortalidad del 17.85 % (5 de 28). En la tabla IX se muestran las características de los animales sacrificados en las diferentes etapas de la metamorfosis para el grupo de *A. mexicanum*.

Tabla IX.

Experimento #3, grupo *A. mexicanum*.

	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV	(x) grupo
perfusión	(n=5)	(n=5)	(n=4)	(n=2)	(n=16)
AVo=	7.8 días	8.días	10.25 días	9. días	8.76 días
ADo=	72.71 %	51.85 %	20.5 días	18 días	19.2 días (n=6)
ABo=	65.51 %	42.18 %	18.25 días	18 días	17.62 días (n=6)
Pi=	28.5 g	30.9 g	32.2 g	33.4 g	31.25 g
Pf =	24.58 g	24.8 g	21.67 g	21.25 g	21.25 g (n=2)

En la tabla se muestran las características de los animales sacrificados en las diferentes etapas de la metamorfosis para el grupo de *A. mexicanum*. En la etapa I no se ha llegado a ADo ni a ABo, por lo que se pone el % de la longitud de las estructuras en ese momento, lo mismo sucede con ABo en la etapa II. El peso inicial corresponde al peso que tenían al comenzar el experimento. El peso final corresponde al peso de los animales el día que fueron sacrificados. En la columna de promedios (x), se descuentan los animales que se sacrificaron en cada etapa.

En resumen, el desarrollo de la metamorfosis evaluado por los cambios en las estructuras anatómicas externas de los *Ambystomas tigrinum* y *mexicanum* durante la metamorfosis inducida

por T4 inducida son: después de un periodo de 2 a 4 días de la aplicación de la T4 se inicia la reabsorción de la aleta ventral la cual llegó a 0 en el *A. mex.* en 9.88 días en promedio (se promedió el grupo *A. mexicanum* del experimento piloto y del experimento #3, tabla VI y IX), y en el *A. tigrinum* con un promedio de 8.9 días (se promedió el grupo *A. tigrinum* del experimento piloto y del experimento #2, tabla VI y VIII). Al mismo tiempo se inicia la reabsorción de la aleta dorsal, que llega a 0 en los *A. mexicanum*. a los 22.81 días en promedio (tabla VI y IX), y en el *A. tigrinum* a los 16.77 días en promedio (tabla VI y VIII), antes de la reabsorción total de las branquias en esta especie. En el *mexicanum*, la reabsorción total de las branquias ocurre al mismo tiempo que la reabsorción de la aleta dorsal, a los 22.81 días en promedio. En algunos animales, la aleta dorsal se reabsorbe después de las branquias. En el *A. tigrinum* la reabsorción total de las branquias es a los 16.88 días en promedio. Posteriormente se cierra la abertura braquial. Antes de la reabsorción total de las branquias, la distancia entre los ojos se reduce y aparecen los párpados. El peso corporal disminuye en relación directa al peso inicial, los animales más pesados pierden más peso que los menos pesados, con una pérdida de entre 10 y 26.30 g.

Experimento #5, Antagonistas de los receptores opioides.

Con respecto al grupo en el que se utilizaron antagonistas de los receptores opioides, los ajolotes no presentaron el proceso de metamorfosis con la administración de naltrexona, naltrindol, y nor-binaltorfimida a dosis de 0.1, 10 y 30 μM y por la vía de administración utilizada (intracraneal), a excepción de los controles inyectados con T4, que tuvieron un curso similar al descrito anteriormente para la metamorfosis del *A. mex.*

Resultados de la inmunohistoquímica a péptidos opioides en las diferentes etapas de la metamorfosis.

En los ajolotes control manipulado (medido y pesado) y vehículo (inyectado con vehículo, medido y pesado), del grupo de los *A. tigrinum* se presentó la metamorfosis espontáneamente, iniciándose en tiempos distintos. Estos animales siguieron el mismo proceso de la metamorfosis espontánea descritos en el experimento piloto, por lo que, se dejó que llegaran a salamandras y se consideraron como de la etapa IV. Los animales del grupo control testigo (sacrificados sin ningún tratamiento el día que inició el experimento de metamorfosis), la inmunorreactividad a los diferentes péptidos opioides no presentó diferencias comparada con la del adulto neoténico del *A. mexicanum*.

Los animales controles del grupo de los *A. mexicanum* no presentaron metamorfosis (nos referimos al control manipulado y al control vehículo). La inmunohistoquímica para los diferentes péptidos opioides fué igual a la del adulto neoténico y al control testigo de los *A. tigrinum*. La inmunorreactividad para los péptidos opioides en la hipófisis de estos animales fue la siguiente:
Nota: La densidad de fibras inmunorreactivas se clasificó cualitativamente en densidad alta = (+++), densidad media = (++) , densidad baja (+). La morfología de las fibras en todos los casos fué de fibras delgadas con varicosidades y fuertemente inmunorreactivas.

IR a LE:

Se localizó en las células del lóbulo anterior (adenohipófisis) (Las figuras que a continuación se describen se encuentran publicadas en el trabajo León-Olea y col., 1991, anexo a esta tesis), (Fig. 1A, pag. 414). En la eminencia media se encontraron fibras IR con varicosidades y una densidad (+++) (Fig. 1E, pag. 414). En el lóbulo nervioso encontramos una

densidad (+) de fibras IR. Las células del lóbulo anterior fueron de dos tipos; columnares y ovoides. Sus tamaños de 32 a 40 μm en su diámetro mayor, y de 6 a 10 μm en el diámetro menor. Las células presentaron por lo menos un polo hacia los espacios sinusoidales (Fig. 2A, pag. 415). y su núcleo (20 X 4 μm .) se situó en el polo opuesto. En ocasiones los dos polos de las células estuvieron en contacto con los espacios sinusoidales (Fig. 3, pag. 415). La IR se encontró únicamente dentro del citoplasma. El lóbulo intermedio no presentó IR a LE (Fig. 1 A, pag. 414).

IR a ME:

Las células adenohipofisarias, en contraposición con lo descrito para LE, no presentaron IR a ME (Fig. 5A pag. 414). En EM se encontraron fibras IR (+++), (Fig. 5C pag. 417). En el lóbulo nervioso se encontró una densidad (+) de fibras IR. No se encontró IR en el lóbulo intermedio.

IR a BE:

Todas las células del lóbulo intermedio fueron IR a BE (Fig. 1B, pag.414). En la adenohipófisis se encontraron células IR a BE, principalmente en el pedículo (parte rostral) y en la porción caudal del lóbulo (Fig. 1F, pag.-414). No hubo IR en las fibras de la EM ni en la neurohipófisis. La morfología y el tamaño de las células IR a BE fueron similares a las descritas para las células IR a LE (Fig. 2B, pag. 415). No hubo coexistencia de la IR a LE y a BE en las células del lóbulo anterior (Fig. 1 y Fig. 4 pag. 414 y 416), (ver discusión del trabajo León-Olea y Col., 1991, pag.417-418).

IR a Din 1-8:

Se encontró una densidad (+++) de fibras IR en la neurohipófisis y una densidad (++) en la EM (Fig. 6A y B, pag. 418). No se observó IR a dinorfina (1-8) en el lóbulo anterior ni en el intermedio.

IR a MERGL:

La distribución de la IR a MERGL fué la misma que la IR a BE, es decir, existen células IR en el lóbulo intermedio y, en el lóbulo anterior algunas células son IR, localizadas principalmente en el pedículo (Fig. 14A). La IR a MERGL se presentó también en las fibras de la eminencia media con una densidad de (+++) (Fig. 14C) y en fibras del lóbulo neural con una densidad de (+), a diferencia de la IR a BE que no presentó fibras IR en la eminencia media y lóbulo neural (Fig. 19A y B).

IR a Din A:

Existen fibras IR (++) en la eminencia media y lóbulo neural (+++) (Fig. 18B).

IR a Din B:

Tiene la misma distribución que la Din A, con fibras IR en la eminencia media (++) y en el lóbulo neural (+++), (Fig. 18C).

Etapa I.

Con los animales que se sacrificaron en esta etapa se realizaron cuatro experimentos de

inmunohistoquímica dos de *A. tigrinum* y dos de *A. mexicanum*. No se encontraron diferencias en la inmunorreactividad a los diferentes péptidos opioides en la hipófisis, entre una especie y otra.

IR a LE:

En esta etapa, la IR a LE en el lóbulo anterior se encontró disminuida o ausente (Fig. 15C). Las fibras IR en EM y en LN se conservaron con las mismas características que el adulto neoténico (Fig. 15A). En el lóbulo intermedio se observó IR de poca intensidad en las células de la periferia del lóbulo (Fig. 15C y D).

IR a ME:

En la etapa I, la adenohipófisis presentó IR baja en algunas células a nivel del pedículo (Fig. 16B), con la misma distribución que las células IR a BE, MERGL y a las células IR a ACTH o cromóforas. En LI también hubo células IR de intensidad baja, con la misma distribución de las células IR de MERGL y BE en este lóbulo (Fig. 14A y 19A). La IR en la fibras de la eminencia media y del lóbulo neural fueron de las mismas características que en el animal neoténico (Fig. 16B y F).

IR a BE:

La IR a BE en todos los lóbulos hipofisarios y en la eminencia media es igual a la descrita para el animal neoténico (Fig. 19A).

IR a MERGL

En el lóbulo neural hubo una densidad de (++) de fibras IR y en la eminencia media una densidad (+++), sin cambios con respecto al adulto neoténico (Fig. 14C). Las células IR del lóbulo intermedio se situaron en la periferia adyacentes a los vasos portales de la EM y del LN (Fig. 14 B). Estas células tienen una forma alargada, uno de sus polos termina en un ensanchamiento y son fuertemente inmunorreactivas. Su diámetro mayor fué de entre 27 y 35 μ . En la adenohipófisis las células IR situadas en el pedículo tuvieron las mismas características que en el animal neoténico (Fig. 14A).

IR a Din 1-8, Din A y Din B:

En la etapa I la IR a estos péptidos no presentó cambios con respecto a la IR descrita para el adulto neoténico (Fig. 18A, B y C, respectivamente).

Etapa II

Para esta etapa se llevaron a cabo cuatro experimentos inmunohistoquímicos dos en *A. mexicanum* y dos en *A. tigrinum*.

IR a LE:

En esta etapa la IR a LE en adenohipófisis se presentó con las mismas características que en el animal neoténico (Fig. 15E y comparar con fotomicrografía A). Además, se encontraron células IR en la periferia del lóbulo intermedio y fibras IR en eminencia media y lóbulo neural

(Fig. 15E (↑)). En uno de los *A. mexicanum*, la IR fué negativa en las células de la adenohipófisis y del lóbulo intermedio, como en la etapa III y IV (Fig. 15G).

IR a ME:

En esta etapa, la IR a ME presentó un aumento en la intensidad de la IR de las mismas células que tuvieron una IR de intensidad baja en la etapa I, nos referimos a las células del pedículo adenohipofisiario (Fig. 16E* , comparar con Fig. 16B■) y a las células IR de la periferia del lóbulo intermedio (Fig. 16C (↑), D (↑) comparar con B (LI*)). Las fibras IR en LN y en la eminencia media se mantuvieron sin cambios (Fig 16F).

IR a BE:

La IR a BE continuó con las mismas características que en el animal neoténico y que en la etapa I (Fig. 19A).

IR a MERGL:

La IR se encontró con la misma distribución y características que en la etapa I (Fig. 14A).

IR a Din 1-8, Din A y Din B:

Se observó la misma distribución y características descrita en las etapas anteriores (Fig. 18A, B y C, respectivamente).

Etapa III

Esta etapa se caracterizó por la reabsorción total de las branquias y las aletas. Son animales con morfología de adultos ó salamandras. Se llevaron a cabo siete experimentos inmunohistoquímicos, cuatro con *A. mexicanum* y tres con *A. tigrinum*.

IR a LE:

En esta etapa en dos de los *A. mexicanum* se observó una disminución importante de la IR en las células adenohipofisarias (como en la etapa I, Fig. 15C), y en otros dos, ausencia total de la IR (Fig. 15G). Las células del lóbulo intermedio no mostraron IR. La IR en el lóbulo neural y en la eminencia media tuvieron las mismas características que el adulto neoténico (Fig. 15G y 15A). En los ajolotes *A. tigrinum*, la IR de las células adenohipofisarias fué de muy baja a negativa, lo mismo que para el lóbulo intermedio, y también se conservó la IR en las fibras de eminencia media y lóbulo neural.

IR a ME:

En esta etapa, dos de los animales de cada especie presentaron IR a ME en el lóbulo anterior y lóbulo intermedio con las mismas características que en la etapa I, es decir, células con IR muy baja en adenohipófisis y lóbulo intermedio, y fibras IR con densidad (+) en neurohipófisis y fibras IR (+++) en la eminencia media (Fig. 16B). En los tres animales restantes, la IR únicamente se presentó en lóbulo neural y eminencia media con las mismas características que en el animal neoténico, es decir, negativa en el lóbulo anterior (Fig. 16A).

La IR a MERGL, BE y dinorfinas no presentó cambios aparentes en su distribución en hipófisis con respecto al adulto neoténico.

Etapa IV

Estos animales tuvieron 10 días o más después de que alcanzaron la morfología de adulto o salamandra. En esta etapa se realizaron cuatro experimentos inmunohistoquímicos uno en *A. mexicanum* y tres en *A. tigrinum*. Las salamandras de la especie *A. mexicanum* presentaron una alta mortalidad por lo que únicamente tuvimos un animal que duró más de 10 días.

IR a LE

En todos los experimentos de esta etapa la IR de las células adenohipofisarias fué negativa, se conservó la IR en las fibras de la neurohipófisis con un discreto aumento en la densidad sin llegar a pasar de la clasificación de densidad baja (+). En la eminencia media también se conservó la IR en fibras con las mismas características que en el neoténico (Fig 15G y H).

La IR a los demás péptidos opioides estudiados se presentó con las mismas características que en el adulto neoténico (Fig. 20, 14A, 16A, 17B, 18A, B y C, y 19A y B).

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, se describen algunos datos.

En los núcleos ventrales hipotalámicos se encontró IR para todos los antisueros de

péptidos opioides estudiados. Existe IR para LE y ME en algunas neuronas subependimarias, 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 hipotalámica; también fibras IR abundantes sobre todo en la zona ventral (Fig. 15F y H, 16Fy G).

La distribución de la IR a péptidos opioides en otras estructuras cerebrales, durante el proceso de la metamorfosis, se conserva como en el estado larvario (tabla III). Sin embargo, en las diferentes etapas de la metamorfosis da la impresión de aumentar o disminuir el número de neuronas inmunorreactivas y/o la intensidad de la IR.

En la figura 20, se muestran esquemas de la hipófisis y el hipotálamo, con la distribución de la IR a los péptidos opioides en el *A. mexicanum* y en el *A. tigrinum* desde la etapa de adulto neoténico hasta la etapa IV. Se muestra también la distribución de la IR a prolactina y ACTH en el adulto neoténico y en la salamandra.

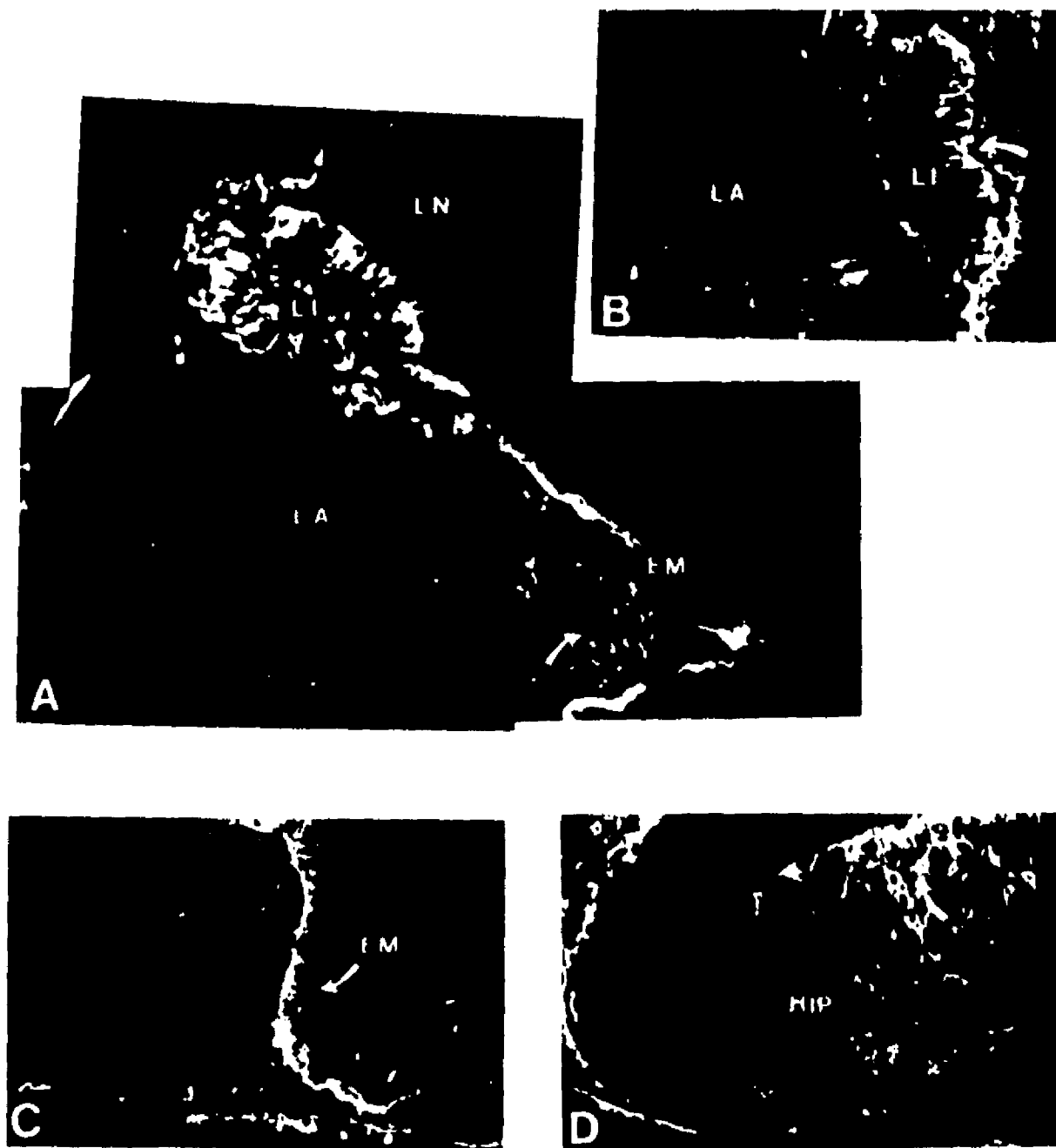


Figura 14.

Inmunorreactividad a MERGL en la hipófisis e hipotálamo del *A. mexicanum* y del *A. tigrinum*, durante el proceso de metamorfosis. Fotomicrografías de cortes parasagitales de hipófisis e hipotálamo, de 15 μ de espesor. **A.** Fotomontaje donde se muestra la distribución de las células IR en el lóbulo anterior, principalmente en la zona del pedículo (parte rostral) (\uparrow), y en el lóbulo intermedio con células IR distribuidas en todo el lóbulo y en la eminencia media, fibras IR (+++), (100 X). **B.** Etapa I. En esta fotomicrografía se muestra el lóbulo intermedio, en donde las células IR se distribuyen en la periferia adyacentes a los vasos portales de la eminencia media y del lóbulo neural (100 X). **C.** Se muestra la eminencia media con fibras IR (+++) (\uparrow). **D.** La fotomicrografía muestra la parte ventral hipotalámica, con fibras IR (+++) y neuronas IR (\uparrow). Abreviaciones: lóbulo anterior (LA); lóbulo intermedio (LI); lóbulo neural (LN); eminencia media (EM); infundíbulo (I); hipotálamo (Hip); densidad alta (+++); densidad media (++); densidad baja (+).

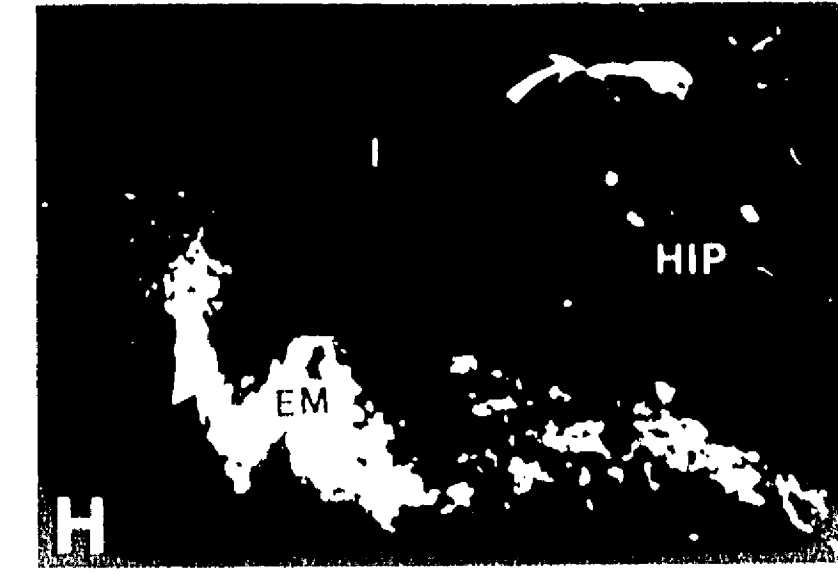
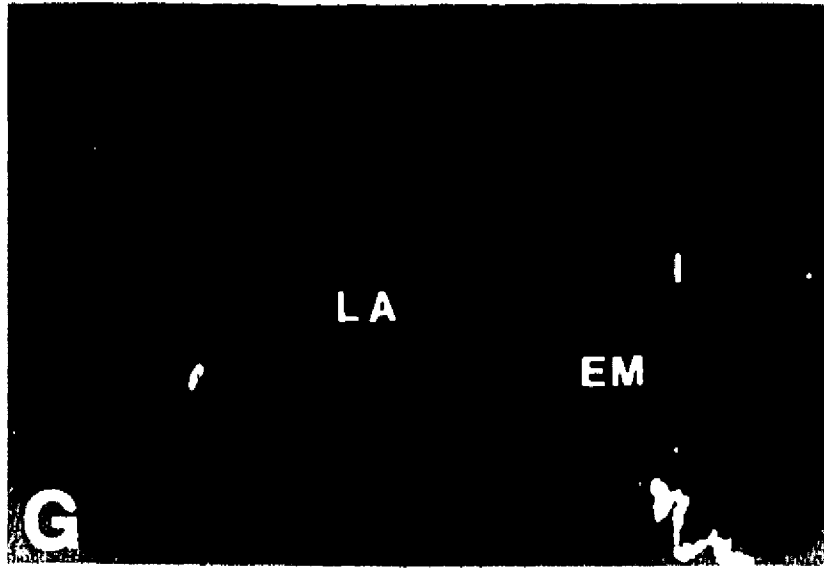
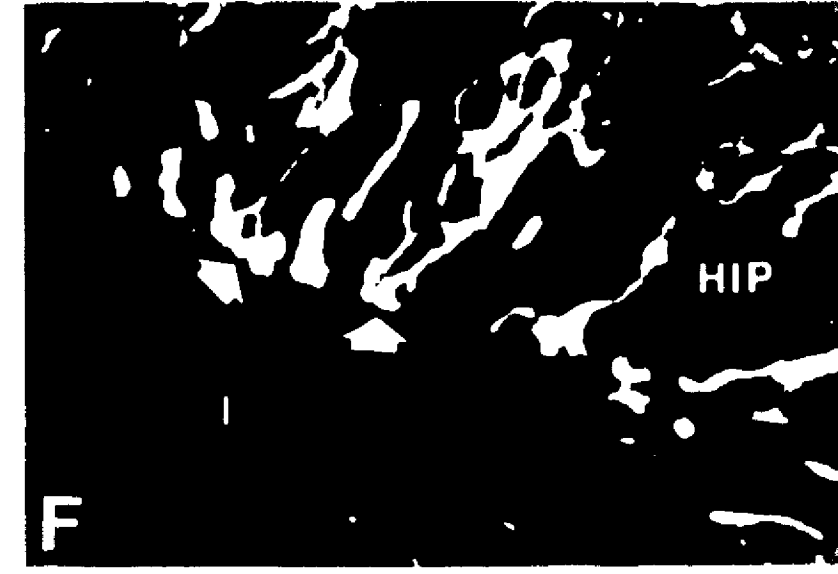
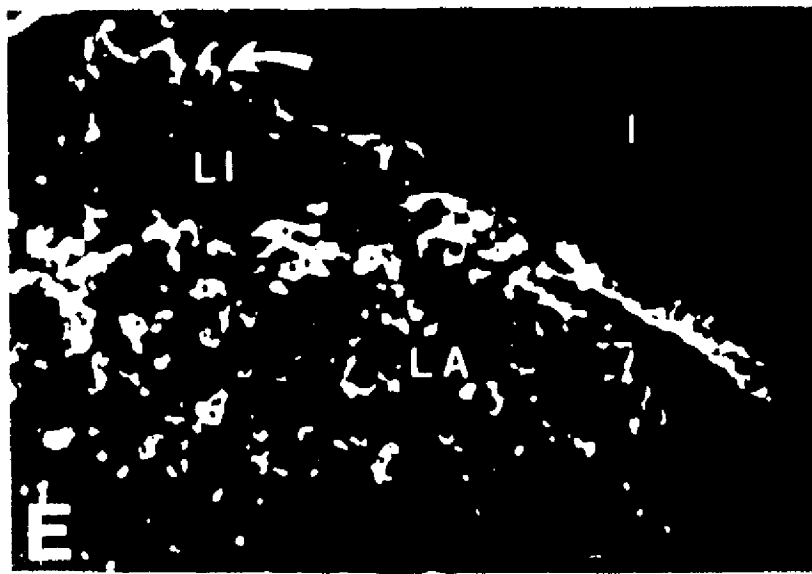
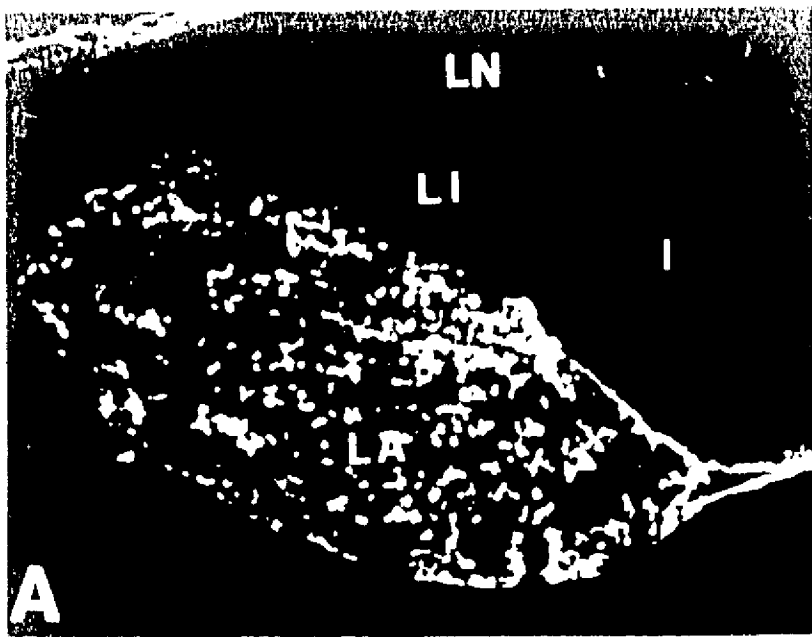


Figura 15.

Inmunorreactividad a LE en hipófisis del *A. mexicanum* y del *A. tigrinum*, durante el proceso de metamorfosis. Fotomicrografías de cortes parasagitales de hipófisis e hipotálamo, de 15 μ de espesor. **A.** Adulto neoténico. Se muestran las células IR en el lóbulo anterior con una distribución homogénea. Nótese que en el lóbulo intermedio no hay células IR. La eminencia media con fibras IR (+++), (40 X). **B.** Amplificación de las células IR del lóbulo anterior. Tienen forma ovoide con el citoplasma fuertemente IR a LE y se disponen en vecindad de los sinusoides hipofisarios (S), (400 X). **C.** Etapa I. Se muestra el lóbulo anterior con ausencia de IR (comparar con A.). En el lóbulo intermedio se observan células con IR baja que se distribuyen en la periferia del lóbulo. En la eminencia media se observan fibras IR (+++), (100 X). **D.** Se muestra una amplificación de las células IR del lóbulo intermedio (\blacktriangle) y las fibras IR de la eminencia media (\uparrow). **E.** Etapa II. Se observa nuevamente una gran cantidad de células IR en el lóbulo anterior y células IR en el lóbulo intermedio con IR más intensa que en la etapa I, (\uparrow). **F.** En esta fotomicrografía se muestra un grupo de neuronas IR situadas en la parte ventral hipotalámica (circunventriculares). Estas neuronas tienen una prolongación que termina en un ensanchamiento en el infundíbulo (\uparrow); algunas de ellas son bipolares, su otra prolongación se dirige hacia la parte ventral hipotalámica (400 X). **G.** Etapa III-IV. La fotomicrografía muestra el lóbulo anterior y el intermedio con ausencia total de IR. En la eminencia media se conserva la IR en las fibras (+++). **H.** Etapa III-IV. En la eminencia media se muestran fibras IR con una densidad de (+++) y una neurona IR (\uparrow) en el hipotálamo, con su prolongación hacia el infundíbulo (250 X). Abreviaciones: lóbulo anterior (LA); lóbulo intermedio (LI); lóbulo neural (LN); eminencia media (EM); infundíbulo (I); hipotálamo (Hip); densidad alta (+++); densidad media (++); densidad baja (+).

Figura 16.

Inmunorreactividad a ME en hipófisis del *A. mexicanum* y del *A. tigrinum*, durante el proceso de metamorfosis. Fotomicrografías de cortes parasagittales de hipófisis e hipotálamo, de 15 μ de espesor. **A.** En el animal adulto neoténico únicamente existe IR en fibras del lóbulo neural (+) y en fibras de la EM con una densidad de (+++). **B.** Etapa I. Nótese que existen células con IR en el pedículo del lóbulo anterior (■) y en las células de la periferia del lóbulo intermedio (*); se conserva la IR de las fibras de la eminencia media. **C.** Etapa II. Fotomicrografía que muestra el lóbulo intermedio con células IR que se distribuyen en la periferia del lóbulo, adyacentes a los vasos portales de la EM y del lóbulo neural (↑) (100 X). **D.** Se muestra una amplificación de una de las células IR del lóbulo intermedio (↑) con su citoplasma fuertemente IR, está situada en la vecindad de los vasos portales (250 X). **E.** En esta fotomicrografía se muestra el pedículo del lóbulo anterior con células IR, corresponde también a la etapa II (100 X). **F.** Se muestra la eminencia media con fibras IR (+++), una neurona IR en el hipotálamo situada en la pared infundibular (↑) (250 X). Esta distribución no cambia durante el proceso de metamorfosis. **G.** Fotomicrografía que muestra un grupo de neuronas IR situadas en la parte ventral hipotalámica (circunventriculares). Estas neuronas tienen una prolongación que termina en un ensanchamiento en el infundíbulo (↑), algunas de estas neuronas son bipolares y su otra prolongación se dirige hacia la parte ventral hipotalámica. En la parte inferior de la fotomicrografía se muestra (↑) una célula subependimaria con su prolongación hacia el neuropilo de la parte ventral hipotalámica (250 X). Abreviaciones: lóbulo anterior (LA); lóbulo intermedio (LI); lóbulo neural (LN); eminencia media (EM); infundíbulo (I); hipotálamo (Hip); densidad alta (+++); densidad media (++) ; densidad baja (+).

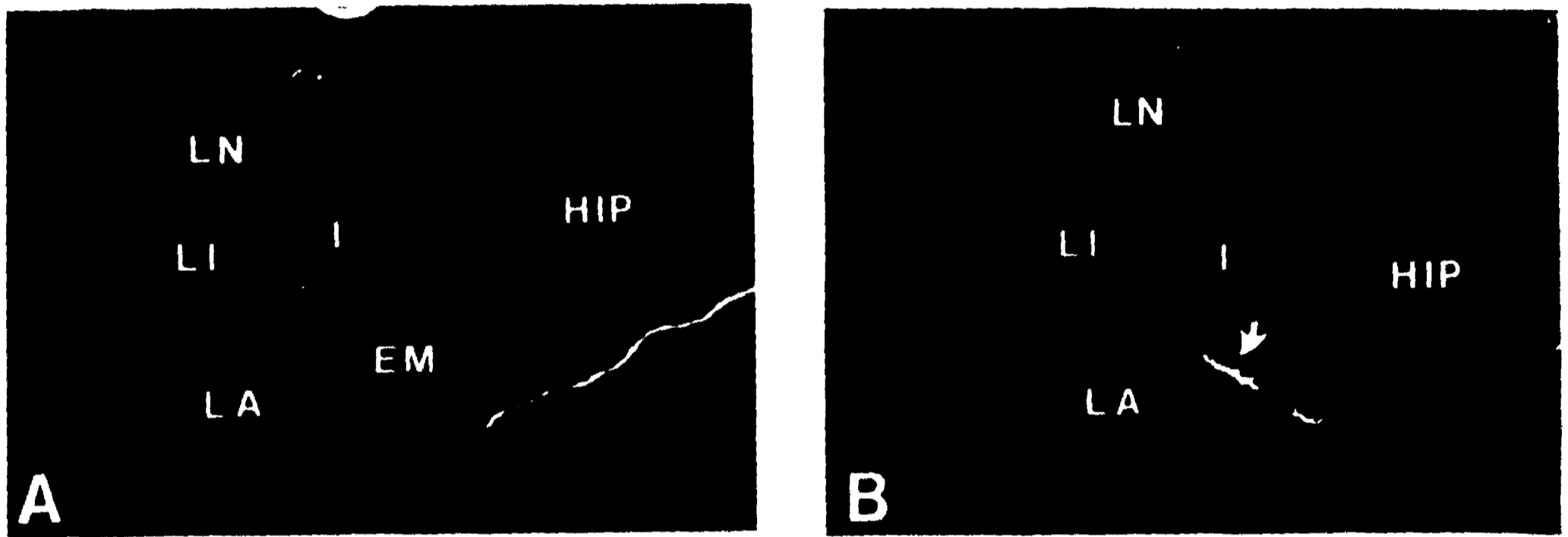


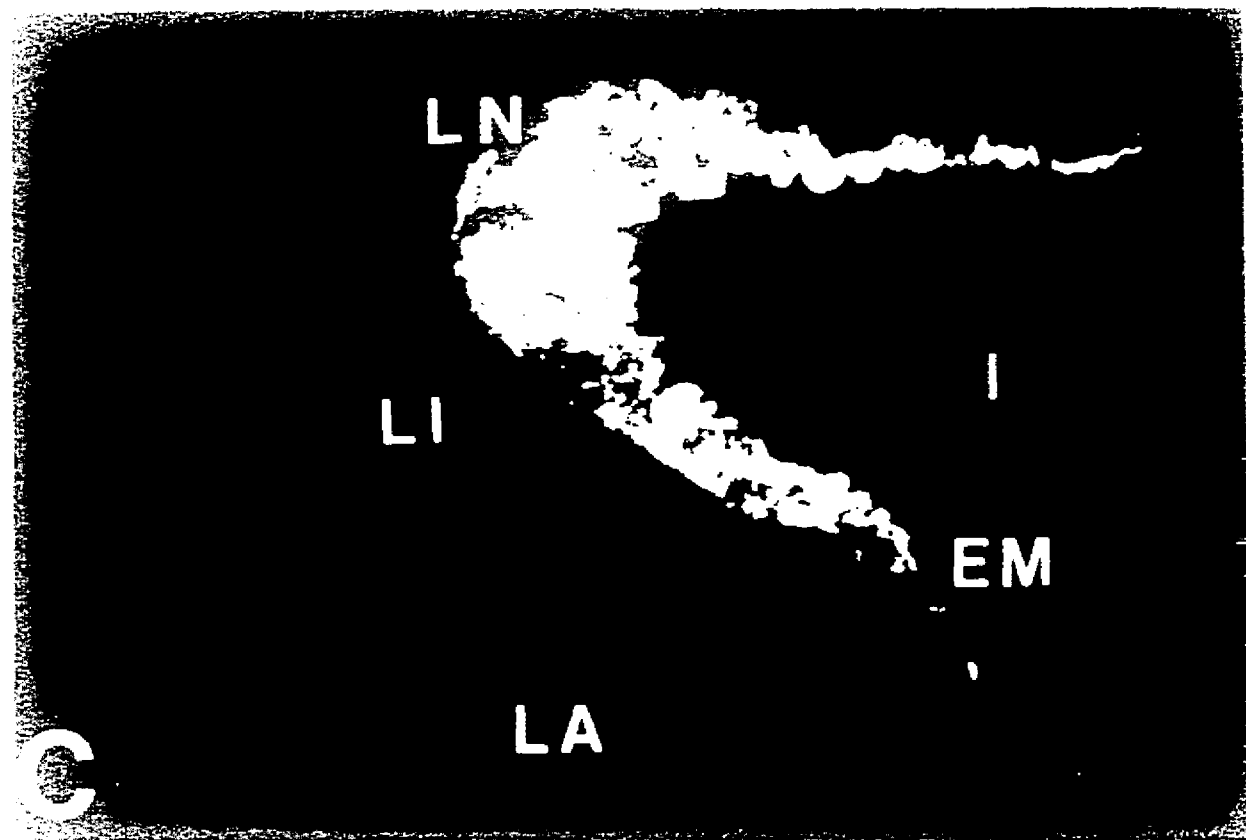
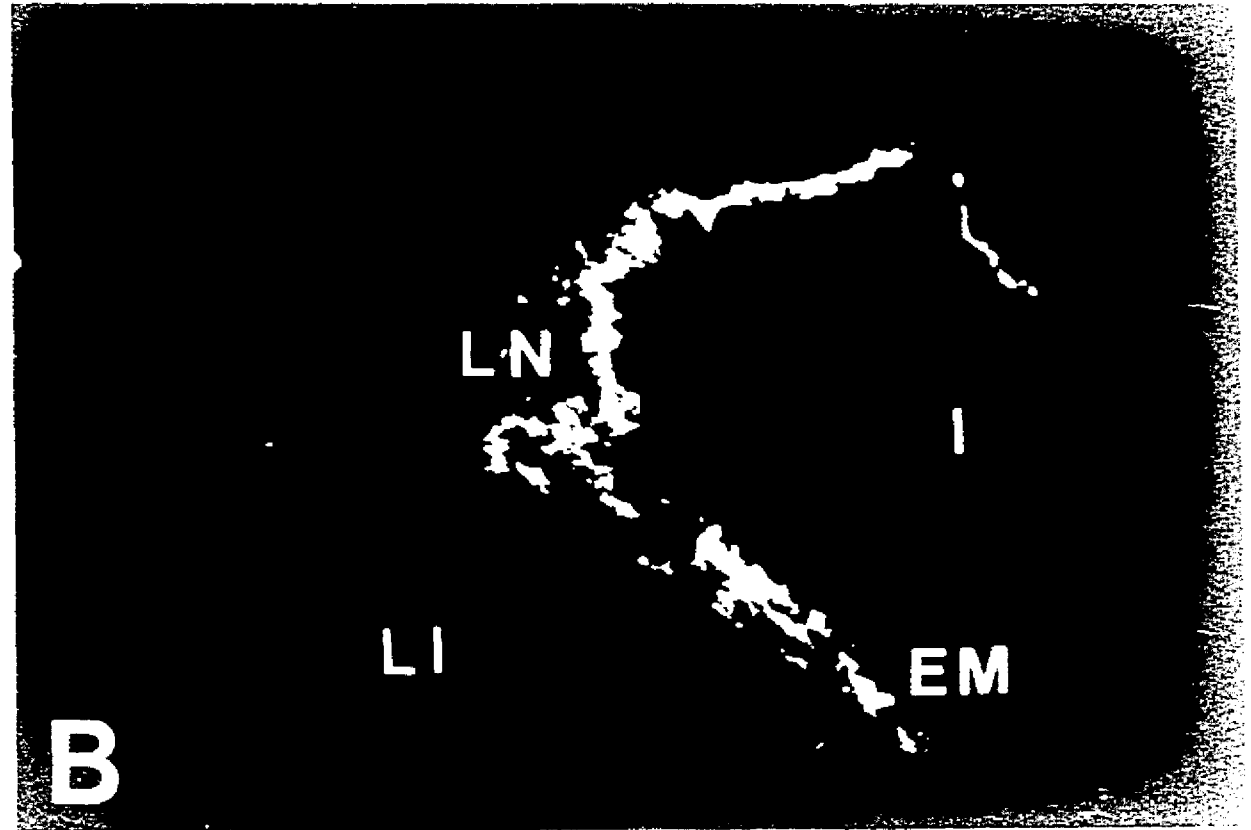
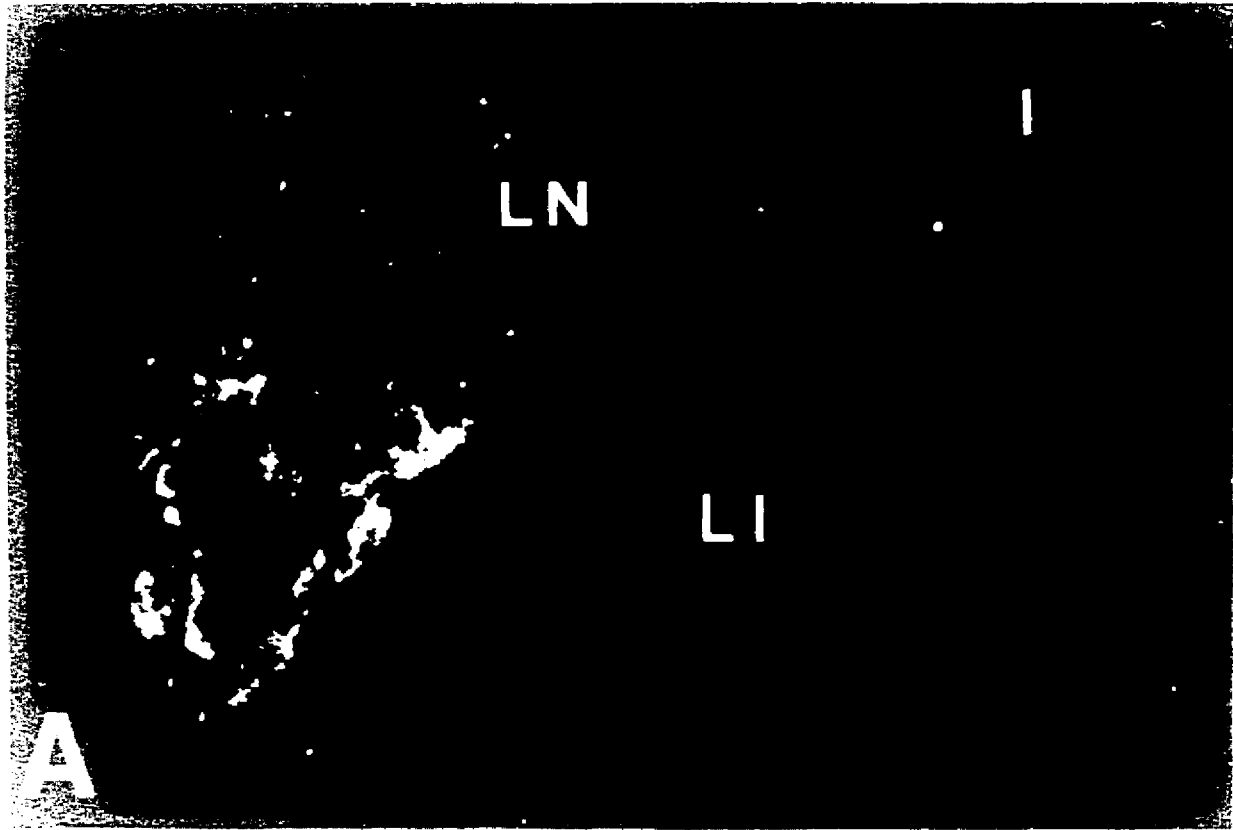
Figura 17.

Inmunorreactividad a LE y ME en hipófisis de las salamandras (etapa IV) del *A. mexicanum* y del *A. tigrinum*. Fotomicrografías de cortes parasagitales de hipófisis e hipotálamo, de 15 μ de espesor. **A.** En esta fotomicrografía se muestra un corte de hipófisis procesado con el anticuerpo para LE. Nótese la ausencia total de IR en el lóbulo anterior y en el lóbulo intermedio. En la eminencia media se conservan las fibras IR con una densidad de (+++), (16 X). **B.** Se muestra un corte procesado con el anticuerpo para ME con ausencia de IR tanto en el lóbulo intermedio como en el lóbulo anterior. En la eminencia media se conservan las fibras IR con una densidad de (+++), (16 X). Abreviaciones: lóbulo anterior (LA); lóbulo intermedio (LI); lóbulo neural (LN); eminencia media (EM); infundíbulo (I); hipotálamo (Hip); densidad alta (+++); densidad media (++); densidad baja (+).

ESTA TESIS
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 18.

Inmunorreactividad a Din 1-8, Din A y Din B en hipófisis del *A. mexicanum* y del *A. tigrinum*. Fotomicrografías de cortes parasagitales de hipófisis, de 15 μ de espesor. **A**, **B** y **C**, muestran la IR a Din 1-8, Din A y Din B respectivamente, en fibras del lóbulo neural y de la eminencia media con una densidad de (+++). La IR a estos péptidos opioides no presenta cambios en las diferentes etapas de la metamorfosis. Nótese que no existe IR para ninguna de las dinorfinas en el lóbulo anterior ni en el lóbulo intermedio (A., 250 X, B. y C., 100 X). **D**. Fotomicrografía que muestra IR a Din B, en el tectum mesencefálico de la salamandra, se observan fibras IR con una densidad de (+++), (250 X). Abreviaciones: lóbulo anterior (LA); lóbulo intermedio (LI); lóbulo neural (LN); eminencia media (EM); infundíbulo (I); tectum mesencefálico (TEC); densidad alta (+++); densidad media (++); densidad baja (+).



Especificidad de los anticuerpos para los péptidos opioides.

En todos los experimentos de inmunohistoquímica, que no se incubaron con el anticuerpo primario, no se presentó fluorescencia (control de omisión del anticuerpo primario), lo mismo ocurrió cuando se omitió el segundo anticuerpo, (omisión del segundo anticuerpo). Los resultados de la preadsorción de los anticuerpos primarios con un exceso (10^{-4} M) de su péptido sintético específico se resumen en la tabla X. En el control para la fluorescencia nativa (control buffer), únicamente se observó fluorescencia en ciertas vesículas o pequeñas gotas cercanas a las paredes ventriculares con una fluorescencia amarillenta.

TABLA X.

Efecto de la preadsorción directa y cruzada de los anticuerpos de LE, ME, MERGL, BE y Din 1-8, con los péptidos sintéticos LE, ME, MERGL, BE Y DIN (1-8) homólogos sobre la intensidad de la fluorescencia.

ANTISUEROS	PEPTIDOS				
	LE	ME	MERGL	BE	DIN 1-8
Anti-LE	---	++-	+++	+++	++-
Anti-ME	+++	---	++-	+++	+++
Anti-MERGL	+++	++-	---	+++	+++
Anti-BE	+++	+++	+++	+--	+++
Anti-Din 1-8	+++	+++	+++	+++	---

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

Resultados de los experimentos de coexistencia:

En los animales neoténicos y en las salamandras fué clara la coexistencia de BE y ACTH en las mismas células y con la misma distribución anatómica. La IR se presentó en todas las

células del lóbulo intermedio y en algunas células del lóbulo anterior, principalmente en el pedículo y otras en la parte ventral y posterior del lóbulo (Fig. 19A, B y C). No hubo IR en la eminencia media ni en el lóbulo neural. La distribución de las células IR a MERGL fué similar a la de la BE y ACTH (comparar con Fig. 14A), la diferencia estuvo en que la IR en fibras de la eminencia media y en el lóbulo neural es negativa para BE y ACTH. Estos péptidos (BE, ACTH y MERGL) no coexisten con las células IR a LE y ME en el lóbulo intermedio, ya que, en el adulto neoténico y en la salamandra no existe IR en estos lóbulos y en el caso de la salamandra desaparece la IR a LE y ME. Sin embargo, con estos experimentos no se pudo esclarecer si hubo coexistencia de MERGL, LE y ME en las fibras IR de la eminencia media y del lóbulo neural.

En cuanto a la IR a prolactina y LE (Fig. 21A, B y D, E) se distribuyeron en la zona media y ventral del lóbulo anterior; sin embargo, no se encontraron células que tuvieran una coexistencia clara de ambos péptidos en los animales neoténicos. En la salamandra la IR a LE desaparece en el lóbulo anterior mientras que la IR a prolactina se conserva sin cambios aparentes.

La IR a LHRH estuvo en las fibras de la EM (+++) y lóbulo neural (+). No existe IR en células del lóbulo intermedio ni en el lóbulo anterior, como era de esperarse. Se encontró IR en diferentes grupos de neuronas y fibras gruesas en la parte ventral del cerebro, desde el telencéfalo hasta la eminencia media y el lóbulo neural. Las neuronas positivas fueron bipolares y grandes ($XX\mu$), localizadas principalmente en el órgano paraventricular y en el septum medial (Fig. 22A, B, C y D).

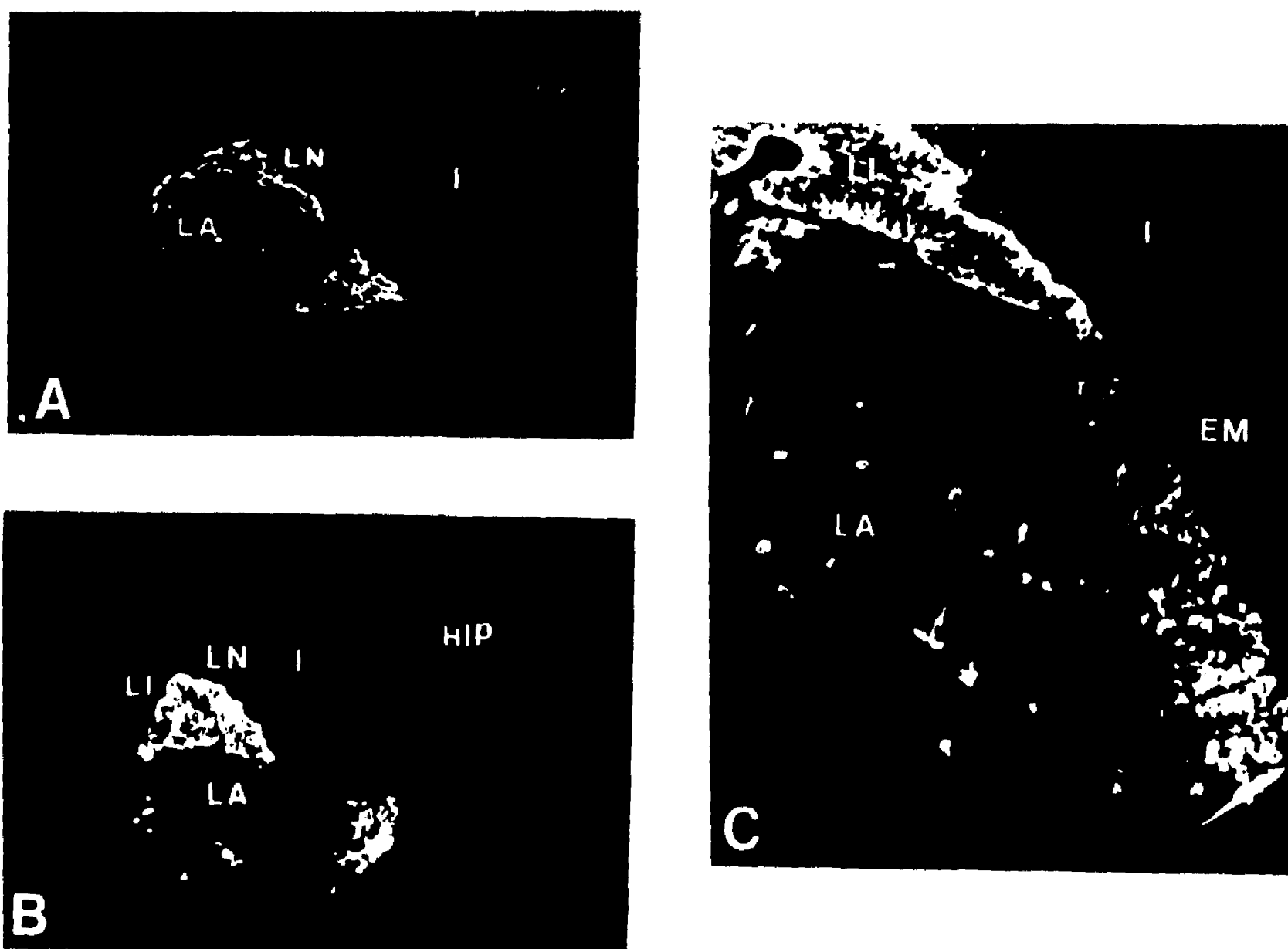


Figura 19.

Inmunorreactividad a BE y ACTH en la hipófisis del *A. mexicanum* y del *A. tigrinum*, durante el proceso de metamorfosis. Fotomicrografías de cortes parasagitales de 15 μ de espesor. **A.** Corte de un axolotl adulto neoténico donde se muestra la distribución de las células IR a BE en el lóbulo anterior, principalmente en la zona del pedículo (parte rostral), y en algunas células en la parte media y caudal de este lóbulo. Todas las células del lóbulo intermedio son IR. No hay IR en la eminencia media ni en el lóbulo neural (16 X). **B.** Se muestra un corte de la hipófisis de la salamandra (etapa IV) con IR a BE, la distribución de la IR no cambia en todo el proceso de la metamorfosis ni en la salamandra (40 X). **C.** Se muestra la distribución de las células IR a ACTH nótese que ésta, es igual a la distribución de la IR a BE (100 X). Abreviaciones: lóbulo anterior (LA); lóbulo intermedio (LI); lóbulo neural (LN); eminencia media (EM); infundíbulo (I); hipotálamo (Hip).

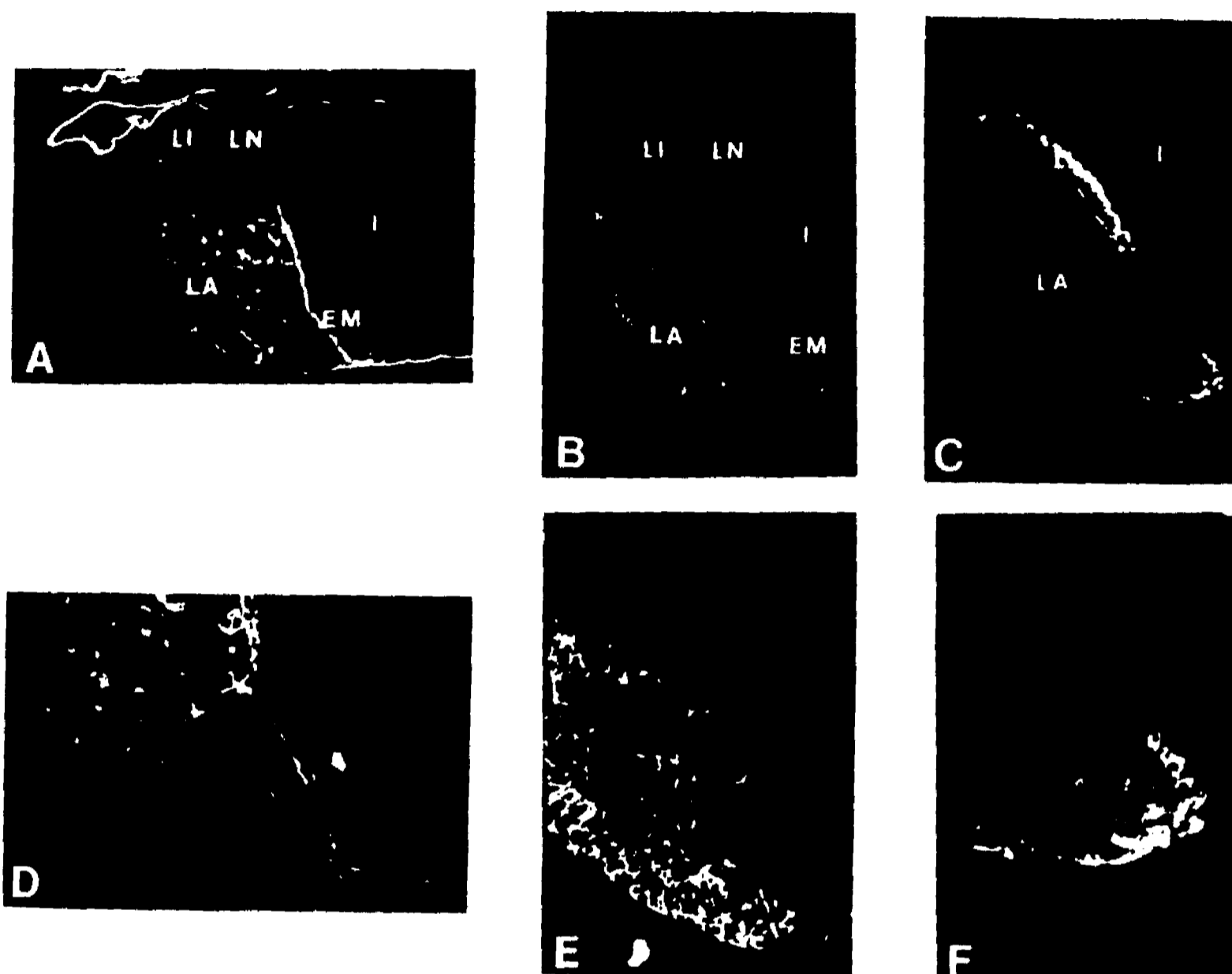


Figura 21.

Distribución de la inmunorreactividad a LE, PRL y ACTH en la hipófisis del *A. mexicanum* y *A. tigrinum*. Fotomicrografías de cortes parasagitales de hipófisis e hipotálamo, de 15 μ de espesor, de animales adultos neoténicos. **A.** Se muestra la distribución de la IR a LE que se encuentra distribuida homogéneamente en células del lóbulo anterior. **B.** Se observa la distribución de las células IR a PRL en el lóbulo anterior, las cuales ocupan una gran parte de la parte media y ventral del lóbulo; nótese que algunas zonas IR a PRL parecen coincidir con la IR a LE mientras que otras no. **C.** Se muestra la distribución de las células IR a ACTH en el lóbulo anterior, principalmente en la zona del pedículo; no muestra correspondencia con la distribución a PRL y LE. En las células del lóbulo intermedio únicamente hay IR a ACTH, es negativo para LE y PRL (A, B, C, 40 X). **D, E y F.** un mayor aumento de la zona del pedículo del lóbulo anterior donde se observan las características mencionadas anteriormente, Nótese que no hay IR en fibras de la eminencia media para prolactina ni para ACTH, (D, E y F, 100 X). Abreviaciones: lóbulo anterior (LA); lóbulo intermedio (LI); lóbulo neural (LN); eminencia media (EM); infundíbulo (I); hipotálamo (Hip); prolactina (PRL).

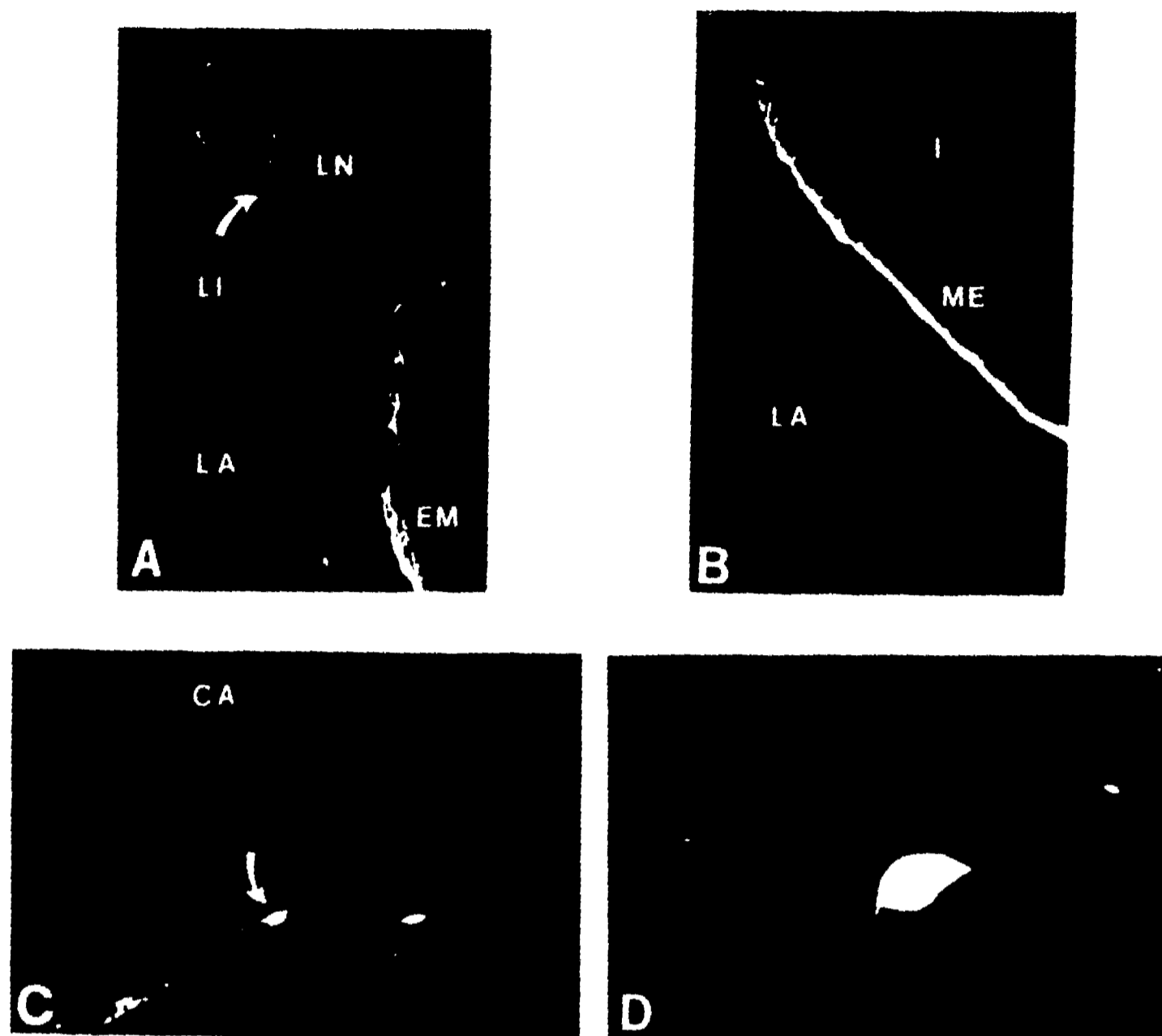
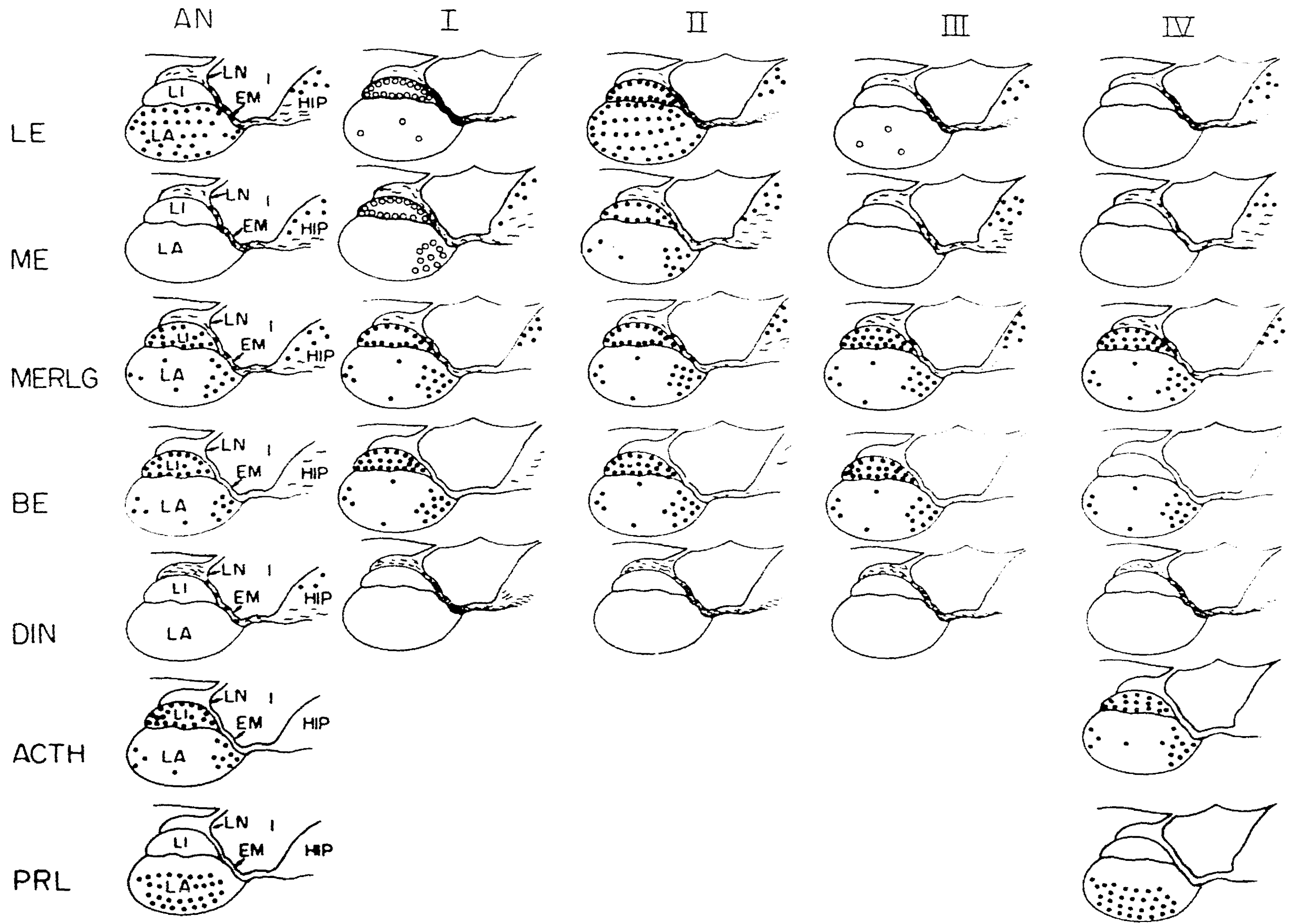


Figura 22.

Inmunorreactividad a LHRH en cerebro e hipófisis del *Ambystoma mexicanum* y *Ambystoma tigrinum*. Fotomicrografías de cortes parasagitales de hipófisis y cerebro, de 15 μ de espesor. **A.** Se muestran fibras gruesas IR en el lóbulo neural con una densidad de (+), (250 X). **B.** Del mismo corte de A, se muestran las fibras IR en la eminencia media con una densidad de (+++); no existe IR en el lóbulo intermedio ni en el lóbulo anterior. **C.** Fibras IR y neuronas (XX μ de diámetro mayor) bipolares situadas en el órgano paraventricular, (\uparrow), (100 X). **D.** Se muestra un aumento mayor de la neurona bipolar de C. (400 X). Abreviaciones: lóbulo anterior (LA); lóbulo intermedio (LI); lóbulo neural (LN); eminencia media (EM); infundíbulo (I); comisura anterior (CA); densidad alta (+++); densidad media (++); densidad baja (+).

Figura 20.

Esquemas que muestran la distribución que tiene la IR a los péptidos opioides en la hipófisis e hipotálamo de *A. mexicanum* y *A. tigrinum* adulto neoténico y en las diferentes etapas del proceso de metamorfosis. Abreviaciones: Leucina-encefalina, LE; Metionina-encefalina, ME; Metionina-encefalina-Arg-Gli-Leu, MERGL; Beta-endorfina, BE; Dinorfina 1-8; Dinorfina A; Dinorfina B, Din; Prolactina, PRL; Hormona adenocorticotrófica, ACTH; Lóbulo neural, LN; Lóbulo intermedio, LI; Lóbulo anterior, LA; Infundíbulo, I; Eminencia media, EM; Hipotálamo, HIP; células IR (●), células con inmunorreactividad baja (○) y fibras IR (líneas onduladas ~). representan fibras IR.



Con las tinciones histológicas de H-E y la modificada de Heidenhain (Kikui y Miki, 1995) se pudo observar que las células gonadotróficas (LH y RH) que son células y basofílicas, y las células IR a LE tienen una distribución similar. Las células cromóforas o con una acidofilia leve tuvieron la misma distribución que las ACTH/ BE positivas.

DISCUSION

Esta tesis muestra los cambios en la IR a varios péptidos opioides (LE, ME, MERGL, BE, Din 1-8, Din A, Din B) en células y fibras situadas en los lóbulos de la hipófisis, de dos especies de *Ambystoma* (*tigrinum* y *mexicanum*) durante las distintas etapas de la metamorfosis, espontánea o inducida.

Comenzaré esta discusión puntualizando cuáles fueron los parámetros anatómicos escogidos para delimitar las etapas de cambios morfológicos que culminan con la transformación de la larva en salamandra. La metamorfosis en los Ambystomas ha sido descrita en múltiples trabajos (Velasco, 1879). Sin embargo, de su sistematización en etapas tenemos únicamente la referencia del trabajo de Norman (1985), para el *A. tigrinum*, a diferencia de los anuros en los que existe una amplia categorización de las etapas de la metamorfosis (Dod y Dod, 1976). Para el *A. tigrinum*, Norman (1985) divide a la metamorfosis en siete estadios o etapas como se muestra en la tabla XI, tomada de su trabajo original.

Tabla XI.	
ETAPAS DE LA METAMORFOSIS DE LA SALAMANDRA TIGRE <i>Ambystoma tigrinum</i>	
Etapas	Definición
I	Cociente de la aleta ventral entre la dorsal = 40 % ó más.
II	Aleta ventral \times 100/aleta dorsal = 25
III	Aleta ventral \times 100/aleta dorsal = 10
IV	Altura de la aleta ventral (0 %).
V	Aleta dorsal \times 100/(altura de la cola y aleta ventral) = 25
VI	Aleta dorsal \times 100/ altura de la cola = 10
VII	Longitud de las branquias (0 %)

En nuestros primeros experimentos se midieron: la altura de la cola, la cual disminuye en relación a la reabsorción de la aleta ventral y dorsal; la longitud de las branquias superior, media, e inferior izquierdas, las cuales se reabsorben al mismo tiempo, por lo que, se tomó en cuenta únicamente la medida de la branquia superior; la longitud total (tomada de la nariz a la cola) no se modifica, al igual que la longitud cola-cloaca; el perímetro de la cintura, está en relación con la ingesta de alimentos, por lo que no se consideró como parámetro de la metamorfosis; el ancho de la cabeza y la distancia entre los ojos disminuyeron, pero no se consideraron por presentar dificultad para la medición, y causar un gran estrés al animal, además de un mayor tiempo de manipulación. En esta tesis eliminamos algunos de estos parámetros que inicialmente fueron tomados en cuenta y que posteriormente no fueron relevantes para la división en las diferentes etapas. Nosotros decidimos utilizar las medidas de la aleta dorsal, de la aleta ventral, la branquia superior y el peso corporal, ya que, estas estructuras son las que presentan los cambios morfológicos más ostensibles y su reabsorción se encuentra acotada temporalmente. Las diferencias fundamentales entre nuestras etapas de clasificación y las de Norman (1985) son en cuanto a la gradación del proceso, aunque esencialmente se trata de los mismos parámetros, excepto que el no toma en cuenta la reabsorción de las branquias hasta la etapa VII o reabsorción total.

La medición de los parámetros anatómicos utilizados para delimitar las etapas de la metamorfosis del *A. tigrinum* y del *A. mexicanum* nos permitió establecer que en el *A. mexicanum* la reabsorción total de la aleta dorsal termina al mismo tiempo o un poco después de la reabsorción total de las branquias, por lo que se clasificaron como de la etapa II a los *A.*

mexicanum que tenían una reabsorción de entre el 40% y el 50% de la aleta dorsal y la reabsorción de las branquias de entre el 40% y 60%, a diferencia del *A. tigrinum* en los cuales se tomó como parámetro de clasificación la reabsorción total de la aleta dorsal (AD= 0).

Con respecto a la inducción de la metamorfosis, se ha reportado (Darras y Kühn, 1984) que la aplicación de T4 a una dosis de 10µg por animal, produjo a las cinco semanas, la reabsorción de las branquias en un 75% y la disminución del 55% en la altura de la cola. En el caso de nuestro experimento piloto, la dosis única de 10 µg por animal, produjo a los 36 días de su inyección, la reabsorción de entre el 10% y 20% en branquias y aletas, respectivamente. Estos mismos resultados se obtuvieron en los animales controles, es decir, no inducidos. En otros experimentos Jacobs y col. (1988) indujeron la metamorfosis con una dosis de 20 µg de T4, la que aplicaron nuevamente en el día 28, ya que no se había llevado a cabo la metamorfosis. Con este esquema de aplicación de T4 (40 µg totales) la reabsorción de las branquias tomó 79 días. En nuestro experimento piloto se utilizaron dosis de 10 y 40 µg (dosis única), las que hasta el día 36 posterior a su administración no produjeron metamorfosis, por lo que se decidió utilizar una dosis única de 100 µg con la que si se llegó a la reabsorción total de branquias y aletas en un promedio de 28 días para el *A. mexicanum* (tabla VI) y de 16 días para el *A. tigrinum* (tabla VI). A partir de este experimento se calculó una dosis de 2.5 µg por g de peso con lo que logramos inducir el proceso de metamorfosis de manera homogénea.

En los experimentos posteriores se logró la reabsorción total de branquias y aletas en un promedio de 19.2 días para el *A. mexicanum* (tabla IX) y de 17.75 días en el *A. tigrinum* (tabla VIII).

La duración de la metamorfosis está en relación directa a la dosis de T4, y al peso del

animal. En los animales del grupo piloto, con un peso inicial promedio de 53.85 g y una dosis de 100 µg de T4 (no ajustada al peso), llegaron a la etapa III en 28 días. Los animales del grupo *A. mexicanum* (experimento #3), con un peso inicial promedio de 31.25 g y una dosis de T4 de 2.5 µg por g, llegaron a la etapa III en 19.2 días promedio. De estos grupos se obtuvieron los primeros animales que presentaron los parámetros morfológicos de cada etapa y se sacrificaron. Estos animales fueron generalmente los menos pesados (tabla IX ver peso inicial promedio de cada etapa), lo mismo ocurrió con el grupo *A. tigrinum* (tabla VIII). Los animales jóvenes y menos pesados presentaron una metamorfosis acelerada, por lo que sugerimos una dosis menor para obtener una metamorfosis gradual.

Norris y Platt (1974) mencionan, que los animales sexualmente maduros (adulto neoténico) tienen una sensibilidad levemente disminuida a la T4 en los tejidos periféricos, lo que ocasionaría que a esta hormona le llevara un mayor tiempo para iniciar su efecto. Estos resultados podrían explicar el retraso que encontramos en la duración de la metamorfosis.

El desarrollo de la metamorfosis, evaluado por los cambios en las estructuras anatómicas externas de los *Ambystomas tigrinum* y *mexicanum* durante la metamorfosis inducida, es un proceso gradual. Este se inicia después de un periodo de 2 a 4 días de la aplicación de la T4, este lapso podría deberse a por lo menos dos factores: la sensibilización de los tejidos a la hormona, que incluye el efecto intracelular, es decir, la latencia de acción de la hormona en la maquinaria celular, y la formación de receptores (Galton, 1988 y 1989).

La metamorfosis no consiste únicamente en el cambio de las estructuras anatómicas externas, sino que, conlleva la maduración o transformación de los diferentes órganos para la adaptación al nuevo medio ambiente. Estos cambios son de tres tipos principalmente: regresión

de las estructuras y funciones que tienen significado únicamente en la larva; transformación de las estructuras larvarias en la forma adecuada para su uso en el adulto y desarrollo de *novo*, de estructuras y funciones esenciales en el adulto, que no estaban presentes en la larva. Por lo que, dividir la metamorfosis con base en los cambios externos más aparentes no resulta ser lo más adecuado. Sin embargo, no se tiene conocimiento exacto de todos los cambios, y sería una lista inmensa tomar en cuenta por ejemplo: niveles de hormonas tiroideas (Larras-Regard y col., 1981) y otras hormonas, cambios en la piel (Kemp 1961), cambios en la producción de urea (Munro, 1953), cambios en las estructuras renales (Fox, 1970), incremento en la producción de proteínas sanguíneas (Hahn 1962). También se debería considerar la maduración de la hemoglobina (Benbassat, 1970; Turner, 1988) maduración y cambios en el sistema nervioso, algunos asociados a las estructuras de neoformación como son, la columna motora lateral de la médula espinal dorsal, por el desarrollo de las extremidades (Beaudoin, 1956), y la maduración de otras estructuras cerebrales como el hipotálamo a expensas de las hormonas tiroideas (Etkin, 1965), o de la somatotropina y prolactina (Hunt y Jacobson, 1971), entre muchos otros.

Para los objetivos de esta tesis la división en etapas con base en los cambios de las estructura anatómicas externas resultó ser lo idóneo.

El objetivo principal de esta tesis fue el de analizar la IR de los péptidos opioides contenidos en la hipófisis de estos *Ambystomas*, y sus posibles cambios durante el proceso de metamorfosis. A continuación consideraremos y discutiremos los hallazgos inmunohistoquímicos.

En los ajolotes adultos neoténicos (*A. mexicanum* y *A. tigrinum*) nuestros resultados

muestran la presencia de fibras IR a LE en el lóbulo neural y en la eminencia media de la hipófisis del axolotl. Estos resultados coinciden con los reportados en aves, en mamíferos, así como en otros anfibios (Bayón y col., 1980b; Watson y col. 1977; Merchenthaler, 1989). En el lóbulo anterior encontramos gran cantidad de células IR a LE (Fig. 15A). Este hecho no se ha reportado en otros vertebrados a excepción del trabajo de Tramu y Leonardelli (1979), en el que reportan la existencia de IR a LE en la adenohipófisis del conejillo de Indias. Otro reporte es el de Dores 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 anatómicamente 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 ME.

En los animales adultos neoténicos, no encontramos IR a ME en las células del lóbulo anterior, a pesar de que este anticuerpo tiene un cruzamiento del 3.83% en condiciones de RIA, Asai y col., 1995). Sin embargo, en las mismas rebanadas, se presentó una intensa IR a ME, en las fibras de la eminencia media, el lóbulo neural, y en neuronas del hipotálamo y en otros núcleos cerebrales (Fig. 16F, G y tabla III). Esta coincide con lo reportado en otros vertebrados (Bayón y col., 1978; Watson y col., 1978). La LE puede provenir de dos precursores: la proencefalina A, o 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 LE encontrada en las células del lóbulo anterior proviene de la prodinorfina, por varias evidencias:

a) 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 LE y en su lugar contenía la secuencia de la ME, con un total de 7 secuencias de ME y ninguna de LE. Este puede ser el caso del axolotl en donde la proencefalina A, no contiene la secuencia de la LE y ésta se genere exclusivamente a partir de la prodinorfina. b) No encontramos IR a ME, que también proviene de la proencefalina. Dores y col. (1993) reportaron que en experimentos realizados con extractos ácidos de cerebro del *A. tigrinum*, y utilizando técnicas de radioinmunoensayo específicas para detectar las encefalinas, seguidas de un análisis de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa, detectaron picos de auténtica ME y LE. Sin embargo, la proporción molar de ME:LE en el cerebro de este anfibio fue aproximadamente de 80:1. Ellos sugieren al igual que nosotros que la LE detectada puede provenir de un precursor diferente a la proencefalina y éste pueda ser la prodinorfina. Para aclarar este hecho, llevamos a cabo experimentos con anticuerpos para dinorfina A (1-8), dinorfina A (1-17) y dinorfina B (rimorfina). Nuestros resultados mostraron IR únicamente en fibras del lóbulo neural, eminencia media (Fig. 18A, B y C), neuronas en el hipotálamo y otros núcleos cerebrales para estos tres anticuerpos, principalmente para la dinorfina B (Fig. 18D). No encontramos IR a ninguna de las dinorfinas en las células del lóbulo anterior (fig. 16) en ninguna de las etapas de la metamorfosis. 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 (Seizinger 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 LE no participan intermediarios estables de alto peso molecular y ésta se encuentra generalmente en forma libre. El procesamiento de la prodinorfina en sus productos finales es específica para cada tejido (Seizinger y col., 1984). La conversión en productos de bajo peso molecular, como la LE, se presenta en algunos núcleos cerebrales, como en la sustancia negra de los mamíferos (Zamir y col., 1984; Sei y Dores, 1990) y en otros anfibios (Sei y col., 1989). Estos hechos no descartan la posibilidad de la existencia de otro precursor que de origen a la LE en estos anfibios. Recientemente Vindrola y col. (comunicación personal) encontraron que en extractos ácidos de cerebro e hipófisis del *A. tigrinum*, la LE eluida en una cromatografía de filtración molecular (Sephadex G-50) y posteriormente cuantificada por RIA, el pico que corresponde a la LE sintética aparece un poco después que la LE del *A. tigrinum*. Esta discrepancia se puede deber a la presencia de grupos sulfatos en la LE como se ha descrito anteriormente (Unsworth y col., 1982), ya que la presencia de al menos un radical sulfato, aumentaría aproximadamente 90 Daltones al peso de la LE. A este respecto podemos decir que las pruebas de especificidad del anticuerpo nos indican que es un anticuerpo altamente específico que reconoce al aminoácido carboxilo terminal (tabla IV y X).

Con los datos anteriores podemos concluir que la IR a LE detectada en las células del lóbulo anterior de la hipófisis no proviene de la proencefalina, como en el caso del *Xenopus*, y sugieren que los precursores pudieran ser la prodinorfina, u otro precursor aún no identificado.

La IR a MERGL en la hipófisis de los *Ambystomas mexicanum* y *tigrinum*, sigue el mismo patrón de distribución que la BE, esto es, células IR en el lóbulo intermedio y en la

adenohipófisis, principalmente en la parte rostral. También existen fibras IR a MERGL en la eminencia media y en el lóbulo neural (Fig. 14A); a diferencia de la BE que no presenta IR en estas estructuras. Llama la atención que en diferentes núcleos cerebrales existe una gran densidad de fibras y neuronas IR a MERGL, ya que se ha reportado que no existe IR a este péptido en otros anfibios ni reptiles (Lindberg and White, 1986, Dores y col., 1993). Sin embargo, existe la posibilidad de que la secuencia de la MERGL esté presente en la proencefalina de este anfibio. Otra posibilidad es que este anticuerpo podría estar marcando un péptido similar. A este respecto, Dores y col. (1993) reportaron que en el cerebro del *A. tigrinum*, con la digestión enzimática de las fracciones del HPLC, con un tiempo de retención de entre 27 y 32.5 min. se vió la presencia de un nuevo péptido un poco mayor a la MERGL, que no coeluye con la MERGL ni con el heptapéptido y tiene un tiempo de retención de 29.5, que es único en este anfibio.

Con lo expuesto anteriormente, podemos concluir que existen similitudes en la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la proencefalina del *Xenopus*, en cuanto a que no existe la secuencia de la LE, y diferencias, como la presencia de un péptido de mayor peso molecular que la MERGL reportado por Dores y col. (1993). Discrepancias similares se han observado en las secuencias del gen que codifica para la proencefalina en los diferentes mamíferos.

La distribución de la IR a BE en la hipófisis del axolotl adulto neoténico, sigue el mismo patrón que para las aves y mamíferos (Bloom y col. 1977). Es decir, no existe IR a BE en el lóbulo nervioso, ni en la eminencia media (Fig. 19A). La BE coexiste con la ACTH, BLPH y MSH ya que todas las células del lóbulo intermedio son IR a BE. Dichas células contienen a estas hormonas en los anfibios (Pezalla y col., 1978) y son péptidos que tienen un precursor

común. La IR a BE no coexiste con la IR a encefalinas (ver Fig. 4A, B, C y D del trabajo León-Olea y col., 1991), 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) Esto sugiere que en los anfibios estos dos sistemas de péptidos opioides están separados, ya que no provienen de un precursor común y no se liberan de las mismas células. La distribución de la IR a BE en el pedículo del lóbulo anterior coincide con la distribución de las células corticotropas (Fig. 19A y C), como se ha reportado para mamíferos (Gramsch y col., 1979; Watson y col., 1978) y otros anfibios (Dores y col., 1989, Oliverreau y col., 1987).

Con respecto a los cambios observados en la IR durante el proceso de la metamorfosis puntualizaremos lo siguiente:

Para la IR a LE en la etapa I encontramos la disminución o ausencia de ésta en las células del lóbulo anterior, con persistencia de fibras IR en la eminencia media y la aparición incipiente de IR en el lóbulo intermedio. La etapa II de la metamorfosis se caracterizó por un reencendido en la IR a LE en las células del lóbulo anterior, misma que vuelve a perderse en los animales con metamorfosis completa. Los puntos extremos, es decir, el estado larvario presenta IR a LE en la adenohipófisis y el estado adulto o salamandra, ausencia. Este hecho, en una primera instancia, nos llevó a pensar que la presencia de LE en las células adenohipofisiarias estaría jugando un papel en el mantenimiento de la neotenia, dado que, esta misma presencia se perdía en el estado adulto. La separación en etapas del proceso de metamorfosis nos permitió distinguir claramente una fase de pérdida de la IR a LE (etapa I) seguida de la reaparición de la IR en la adenohipófisis (etapa II). Si bien no podemos encontrar un correlato morfofuncional a estos

hallazgos, estos hechos dejan entrever una acción más compleja no valorable con los métodos inmunohistoquímicos utilizados en esta tesis. Esto nos ha llevado a replantear el problema para puntualizar si se trata de una depleción por liberación durante la etapa I, o una falta de producción. Estos experimentos se llevan a cabo en la actualidad con técnicas de RIA y rebasan los objetivos de esta tesis. Al respecto se ha reportado (Cano-Martinez, 1995) la cuantificación de estos péptidos por el método de RIA, durante la metamorfosis inducida del *A. mexicanum*, en la hipófisis total. Los resultados del contenido de LE coinciden temporalmente con lo reportado en esta tesis, sin poder esclarecer, desgraciadamente su significado funcional.

La IR a ME presenta un patrón distinto al de la LE en el transcurso de la metamorfosis. Durante el estado larvario no existe IR a este péptido en las células de la adenohipófisis y tampoco en el lóbulo intermedio (Fig. 16A). En la etapa I, se observa la presencia de IR poco intensa en los sitios antes descritos (Fig. 16B). En la etapa II, esta IR se presenta con una mayor intensidad en las células del lóbulo intermedio dispuestas periféricamente (Fig. 16C y D), y en las células de la parte rostral (pedículo) del lóbulo anterior, para volver a desaparecer al completarse la metamorfosis en la salamandra. (Fig. 17B). La IR a ME en las fibras de la eminencia media y del lóbulo neural se conserva tanto en la larva como en la salamandra, y no cambia durante la metamorfosis. Estos datos sugieren la activación del sistema de la proencefalina. Esta misma actividad cesa o disminuye en la salamandra.

La IR a la MERGL durante la metamorfosis presenta una distribución similar a la de la BE con la diferencia que encontramos que presenta una redistribución de la IR en el lóbulo

intermedio hacia la periferia en la etapa I como se puede observar en la Fig. 14B. Esta redistribución se presenta también para la IR a LE y ME, de forma acentuada en la etapa II como se puede observar en la Fig. 15E y 16C. Estas imágenes sugieren una activación del gen que codifica para la proencefalina en estas células. En las etapas subsiguientes la distribución de la IR a MERGL se mantiene como en el adulto neoténico.

La distribución de la IR a BE, Din 1-8, Din A y Din B, durante las diferentes etapas de la metamorfosis y en la salamandra se mantiene con las mismas características que en el estado larvario. Para la IR a ACTH y prolactina no se observaron cambios aparentes en su distribución en la larva y la salamandra. Llama la atención que la IR a ACTH y BE no cambia durante la metamorfosis, aunque en estas células se presenta concomitantemente, en la etapa II, IR a ME. Esto sugiere que las células adenocorticotropas durante la metamorfosis codifican el gen para la proencefalina; sin embargo, no podemos descartar que esta IR provenga de la ME contenida en la secuencia de la BE, ya que no se ha reportado que estos dos péptidos coexistan o se coliberen de las mismas células.

Cano-Martínez (1995) ha reportado un incremento en la T3 durante etapas de la metamorfosis análogas a las reportadas en esta tesis. Para precisar, reporta un incremento importante en los niveles de T3, entre el estado larvario y la etapa I que continúa hasta la etapa II (etapa II-III de esta tesis), a partir de la cual parece alcanzar sus valores máximos (plateau), para posteriormente presentar, en la etapa III y hasta la etapa IV (etapa III de esta tesis), una ligera disminución. Esta curva muestra la actividad de una hormona ligada a altas demandas en los procesos metabólicos. Este hecho fue sugerido por Etkin en 1935. Desde entonces se ha

reportado por varios grupos el aumento de las hormonas tiroideas durante el proceso de metamorfosis tanto en los anuros (Weil, 1985; Weber y col., 1994, Niinuma y col., 1991) como en urodelos (Larras-Regard y col., 1981; Cano-Martínez, 1995). Existen otros reportes de las variaciones que presentan diferentes neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas durante el desarrollo de la metamorfosis (Norris y col., 1992; Carr y Norris, 1990, Schlesinger, 1981). Sin embargo, hasta el momento no es posible hacer un correlato morfofuncional.

La presencia de la IR a LE en el estado larvario y su desaparición en la salamandra nos sugirió que este péptido pueda jugar un papel inhibitorio en el desarrollo de la metamorfosis o en el mantenimiento de la neotenia. Se ha reportado un efecto modulador opioidérgico sobre la dopamina (Haskins, 1981; Gudelsky y Porter, 1979; Morel y Pelletier, 1986; Meites y col., 1979). A su vez la dopamina ejerce un efecto inhibitorio sobre la liberación de la prolactina, hormona que se ha asociado al mantenimiento de la neotenia (Darras y Kühn, 1984; Platt, 1976; Larras-Regard, 1985). En esta línea de pensamiento realizamos los experimentos con antagonistas de los opioides endógenos (naltrexona, binaltorfimida y naltrindol) con el objeto de tratar de precipitar la metamorfosis. Con las dosis y la vía de administración utilizadas, no fue posible precipitar la metamorfosis, lo que sugiere que los opioides endógenos no tienen un papel protagónico en el mantenimiento de la neotenia. Esto se presenta como un problema mucho más complejo, que encierra una integración hormonal que no se encuentra bien elucidada y que escapa a los objetivos de esta tesis, ya que para dar una explicación satisfactoria hay que establecer correlatos mas finos a nivel de interacciones funcionales neuroendócrinas.

Los experimentos de coexistencia demostraron que la BE y la ACTH se encuentran en las mismas células y regiones, como ya se mencionó anteriormente, esto es, en las células del

lóbulo intermedio que ha su vez son melanotropas y en las células de la porción rostral del lóbulo anterior o corticotropas. Estos resultados concuerdan con lo que se había demostrado para anfibios (Dores y col., 1993) y otras especies (Bayón y col., 1980 y 1980b; Gramsch y col., 1979).

Existe IR para LE, ME, MERGL, dinorfinas y para la LHRH, en las fibras de la eminencia media y el lóbulo neural. Con nuestros resultados no se puede dar una evidencia clara de coexistencia, ya que la IR es muy intensa sobre todo en el caso de la eminencia media y con los dos conjugados (rodamina y fluoresceína) se observó fluorescencia en las mismas fibras. Es necesario un examen a nivel de microscopía electrónica para asegurar estos hechos. Existen reportes de coexistencia de encefalinas y dinorfinas con oxitocina y vasopresina en estas fibras de la eminencia media y el lóbulo neural (Martin y Voigt, 1981; Watson y col., 1982).

La IR a LE en las células del lóbulo anterior y la IR a prolactina parecen coincidir en algunas regiones del lóbulo anterior (Fig. A, B y D, E). Sin embargo no se encontraron células con doble marcaje. La distribución de la LE es más parecida a la distribución de las células gonadotropas (Mikami, 1992). Al respecto existen trabajos que reportan la coexistencia de LE y LH y FSH en adenohipófisis de conejillo de Indias (Tramu y Leonardelli, 1979), y la coexistencia de prodinorfina con LH y FSH, en mamíferos (Khachaturian y col., 1986).

La existencia de IR a péptidos opioides en las células de los lóbulos intermedio y anterior de la hipófisis, así como, en fibras de la eminencia media y el lóbulo neural, y las variaciones de la IR a estos péptidos durante la metamorfosis sugiere una relación funcional moduladora, ya sea de forma parácrina o endócrina, con el proceso de maduración y desarrollo que implica la metamorfosis.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Akil H, Mayer D, Liebeskind J: Antagonism of stimulation produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science*, 191: 961-962, 1976.
3. Allolio B, Winkelmann 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.
4. 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.
5. Asai M, Matamoros-Trejo G, Talavera E, Cano-Martínez, Avila M E: Opioid peptides content in the rat brain during the ictal phase and after pentylentetrazol-kindled rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A: 241-245, 1995.
6. 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.
7. 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. USA*, 7: 3503-3506, 1978.
8. 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. (b).
9. 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.
10. Beaudoin A R: The development of lateral motor column cells in the lumbosacral cord in *Rana pipiens*. II. Development under the influence of thyroxin. *Annat. Rec.*, 125: 247-259, 1956.
11. Benbassat J: Erythroid cell development during natural amphibian metamorphosis. *Develop. Biol.*, 21: 557-583, 1970.
12. 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.

13. Beckett A H, Casy A F: Synthetic analgesics: stereochemical considerations. *J. Pharm. Pharmac.* 6: 986-999, 1954.
14. Bern, H.A., Nicoll, C.S. y Strohman, R.C.: Prolactin and tadpole growth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126: 518-520, 1967
15. 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.
16. 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.
17. Bloom F E, Battenberg E, Rossier J, Ling N, Gillemin R: Neurons containing B-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: Immunocytochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1591-1595, 1978.
18. Bonnet K A, Grotin J, Gioamnin T, Cortes M, Simon E J: Opiate receptor heterogenicity in human brain regions. *Brain Res.*, 221: 437-440, 1981.
19. 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, pp 9- 17, 1976.
20. Braks J A M, Guldmond K C W, Van Riel M C H M, Coenen A J M, Martens G J M: Structure and expression of *Xenopus* prohormone convertase PC2. *FEBS Lett.*, 305: 45-50, 1992.
21. Brauth S: Enkephalin-like immunoreactivity within the telencephalon of the reptile *Caiman crocodilus*. *Neuroscience*, 11 (2): 345-358, 1984.
22. 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.
23. Buatti M, Pastermak G: Multiple opiate receptors: phylogenetic differences. *Brain Res.*, 1218: 400-405, 1981.
24. Buckingham J C, Cooper T A: Differences in hypothalamo-pituitary adrenocortical acitivity in the rat after acute and prolonged treatment with morphine. *Neuroendocrinology*, 38: 411-417, 1984.
25. Bunn S J, Hanley M R, Wilkin G P: -Evidence for a kappa-opioid receptor on pituitary astrocytes: an autoradiographic study. *Neurosci. Lett.*, 55:317-323, 1985.

26. Bzdega T, Chin H, Kim H, Jung H H, Kozak C A, Klee W A: Regional expression and chromosomal localization of the δ opiate receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:9305-9309, 1993.
27. Cano-Martínez A: Péptidos Opioides en los anfibios. *Salud Mental*, 18: 23-38, 1995.
28. Carr J, Norris D: Immunohistochemical localization of corticotropin -releasing factor and arginine vasotocinlike immunoreactivitis in the brain and pituitary of the American bulfrog *Rana catesbiana* during development and metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78: 180-188, 1990.
29. 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.
30. Chang K J, Cuatrecasas P: Multiple opiate receptors. *J. Biol. Chem.*, 254: 2610-2618, 1979.
31. Chang W L, Gainer H, Russell J, Loh Y: Proopiomelanocortin-converting enzyme activity in bovine neurosecretory granules. *Endocrinology*, 111: 1607-1614, 1982.
32. Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley J A, Yu L: Molecular cloning and functional expression of mu-like opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.*, 44: 8-12, 1993.
33. Chen Y, Mestek A, Liu J, Yu L. Molecular cloning of κ opioid receptor reveals sequence similarities to the μ and δ opioid receptors. *Biochem J* 295: 625-628, 1993. (b)
34. 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.
35. Clarke G, Wood P, Merrick L, Lincoln L W: Opiate inhibition of peptide release from the neurohumoral terminals of hypothalamic neurons. *Nature, London* 282: 746-748, 1979.
36. Colt E W D, Wardlaw S L, Frantz A G: The effect of running on plasma β -endorphin. *Life Sci.*, 28: 1637-1640, 1981.
37. 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 London*, 295: 663-664, 1982.
38. Cone C, Goldstein A: A dynorphin-like opioid in the central nervous system of an amphibian. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79: 3345-3349, 1983.
39. Copolov D L: Opioid biology: The next set of questions. *Aust Nz J. Med.*, 15: 98-106, 1985.

40. Cuvier, G: *Le règne animal distribué d'après son organisation, pour servir de l'histoire naturelle des animaux, et d'introduction à l'anatomie comparée*. (2nd ed.) Fortin, Paris, 1828.
41. Darras V M, Kuhn E R: Effects of TRH, bovine TSH, and pituitary extracts on thyroidal T4 release in *Ambystoma mexicanum*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 51:286-291, 1983.
42. Darras V M, Kuhn E R: Difference of the *in vivo* responsiveness to thyrotropin stimulation between the neotenic and metamorphosed axolotl, *Ambystoma mexicanum*: failure of prolactin to block the thyrotropin-induced thyroxine release. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56: 321-325, 1984.
43. Deviche P, Moore F L: Biochemical characterization and urodele distribution of 3H-naloxone binding sites in a urodele amphibian. *Soc. Neurosci. Abs.*, 392.4: 981, 1989.
44. Dodd M H I, Dodd J M: The biology of metamorphosis. En: *Physiology of the Amphibia*. Lofts B (Ed). vol. 3. Academic Press, Inc. New York, pp.467-599, 1976.
45. 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.
46. Dores R M, Rothenberg M E: Isolation of immunoreactive β -endorphin-related peptides from the posterior pituitary of the amphibian, *Xenopus laevis*. *Peptides*, 8: 1119-1125, 1987.
47. Dores R M, Meza J C, Schenk L M, Carr J A, Norris D O: Detection of adrenocorticotropin-related and -melanocyte-stimulating hormone-related substances in the anterior pituitary of larval and adult *Ambystoma tigrinum* (Class: Amphibia). *Endocrinol*, 124: 1007-1016, 1989.
48. Dores R M, McDonald L, Purdom L, Sei C: Reverse phase HPLC analysis of proenkephalin-related and prodynorphin-related end-products in the brain of urodele amphibian, *Ambystoma tigrinum*. *Brain Behavior and Evolution*, 42: 69-76, 1993.
49. Dores R M, Sandoval F L, McDonald L K: Proteolytic cleavage of ACTH in corticotropes of sexually mature axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Peptides*, 14: 1029-1035, 1993.
50. 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.
51. Erspamer V, Melchiorri P: Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. *Trends Pharmacol Sci* 1: 391-395, 1980.
52. Erspamer V, Melchiorri P, Falconieri Erspamer G, Montecucchi P C, de Castiglione R: *Phyllomedusa skin*: a huge factory and storehouse of a variety of active peptides. *Peptides (suppl 3)*: 7-14, 1985.

53. Etkin W: Mechanisms of anuran metamorphosis. I. Thyroxine concentrations and the metamorphic pattern. *J. Exp. Zool.*, 71:317-340, 1935.
54. Etkin W: The phenomena of amphibian metamorphosis. IV. The development of the median eminence. *J. Morphol.* 116:371-378, 1965.
55. Etkin, W y Gona, A G: Antithyroid action of prolactin in the frog. *Life Sci.* 6: 703-707, 1967.
56. Evans C J, Keith Jr D E, Morrison H, Magendzo K, Edwards R H: Cloning of delta opioid receptor by functional expression. *Science*, 258:1952-1955, 1993.
57. 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. USA.* 79: 5435-5437, 1982.
58. Fox H: Tissue degeneration: an electron microscopic study of the pronephros of *Rana temporaria*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 24:139-157, 1970.
59. 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.
60. Fricker L, Snyder S H: Purification and characterization of enkephalin-convertase an enkephalin-synthesizing carboxipeptidase. *J. Biol. Chem.*, 258: 10950-10955, 1983.
61. Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H: Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor δ - and μ -subtypes. *FEBS Lett* 327: 311-314, 1993.
62. Gailden 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.
63. Gaillard R C, Grossman A, Smith R, Rees L H, Besser G M: The effects of met-enkephalin in patients with adrenocortical disease. *Clin. Endocrinol.*, 14: 471-478, 1981.
64. Galton V A: The role of thyroid hormone in amphibian development. *Amer. Zool.* 28: 309-318, 1988.
65. Galton V A: The role of 3,5,3'-triiodothyronine in the physiological action of thyroxine in the premetamorphic tadpole. *Endocrinology*, 124: 2427-2433, 1989.
66. Goldstein A, Ghazarossian V E: Immunoreactive dynorphin in pituitary and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6207-6210, 1980.

67. Goldstein A, Lowney I, Palk: Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener, levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 1742-1747, 1971.
68. Gona O y Gona A G: Effect of prolactin on thyroid hormone action. *J. Endocrinol.* 68: 349-358, 1976
69. 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.
70. Gramsch C, Holtt 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.
71. 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.
72. Gubler U, Seeburg P, Hoffman B J, Gage L P, Udenfriend S: Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature London*, 295: 206-208, 1982
73. Gudelsky G A, Porter J C: Morphine and opioid peptide-induced inhibition of the release of dopamine from tuberoinfundibular neurons. *Life Sci.*, 25: 1697-1702, 1979.
74. 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.
75. Gudernatsch J F: Feeding experiments on tadpoles. 1. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation: a contribution to the knowledge organs with internal secretion. *Arch. EntwMench. Org.*, 35: 457-483, 1912.
76. 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.
77. Hahn E W: Serum protein and erythrocyte changes during metamorphosis in paedogenic *Ambystoma tigrinum mavortium*. *Comp. Biochem. Physiol.* 7:55-61, 1962.
78. Harris J P: A review of pertinent literature on the thyroid of urodela, with special reference to *Necturus*. *Field Lab.*, 24: 21-36, 1956.
79. Haskins J T, Gudelsky G A, Moss R L, Porter J C: Iontophoresis of morphine into the arcuate nucleus: Effects on dopamine concentrations. *Endocrinology*, 108: 767-771, 1981.

80. Herrick J C: *The brain of the tiger salamander. Ambystoma tigrinum*. The University of Chicago and London Press: 1948.
81. Herkenham M, McLean S: Mismatches between receptor and transmitter localizations in the brain. En C.A. Boast E, Snowhill and C.A. Altar (Eds.), *Quantitative Receptor Autoradiography*, Alan Liss, New York, pp. 137-171, 1986.
82. 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.
83. Hughes J: Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.*, 88: 295-308, 1975.
84. Hughes J, Smith T, Kosterlitz H, Fothergill L, Morgan B, Morris H: Identification of two related peptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature, London*, 255: 577-579, 1975.
85. Hunt R K, Jacobson M: Neurogenesis in frogs after early larval treatment with somatotropin or prolactin. *Devel. Biol.*, 26: 100-124, 1971.
86. Hutton J C: Subtilisin-like proteinases involved in activation of proproteins of the eukaryotic secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2: 1131-1142, 1990.
87. Iversen L, Iversen S, Bloom F, Vargo T, Guillemin R: Release of enkephalin from rat globus pallidus *in vitro*. *Nature, London*, 271: 679-687, 1978.
88. Iversen L L, Iversen S D, Blook F E: Opiate receptors influence vasopressin release from nerve terminals in rat neurohypophysis. *Nature, London*, 284: 350-351, 1980.
89. Jacobs G F, Michielsen R P A, Kühn E R: Thyroxine and triiodothyronine in plasma and thyroids of the neotenic and metamorphosed axolotl *Ambystoma mexicanum*: influence of TRH injections. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 70: 145-151, 1988.
90. Jenkin P H: *Control of Growth and Metamorphosis*. (Pergamon, Oxford), 1970.
91. Josefsson J O, Johansson P: Naloxone-reversible effects of opioids on pinocytosis in *Amoeba proteus*. *Nature, London*, 282: 78-80, 1979.
92. Kakidani H, Furatani Y, Takahashi H, Noda H, Marimato Y, Hirose T, Asai M, et al: Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neoendorphin/dynorphin precursor. *Nature, London*, 298: 245-249, 1982.
93. Kalra S P, Kalra P S: Opioid-adrenergic-steroid connection in regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinol.*, 38: 418-426, 1984.

94. Kavaliers M, Hirst M: Naloxone-reversible stress-induced feeding and analgesia in the slug *Limax maximus*. *Life Sci.*, 38: 203-209, 1986.
95. 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.
96. Kemp N E: Replacement of the larval basement lamella by adult-type basement membrane in anuran skin during metamorphosis. *Develop. Biol.*, 3: 391-410, 1991.
97. Khachaturian H, Lewis E, Schafer K H, Watson S: Anatomy of the CNS opioid systems. *Trends Nerv. Sys.*, 8: 111-118, 1985.
98. Khachaturian H, Sherman T G, Lloyd R V, Civelli O, Douglass J, Herbert E, Akil H, Watson S J: Prodynorphin is endogenous to the anterior pituitary and is colocalized with LH and FSH in the gonadotrophs. *Endocrinol.*, 119: 1409-1411.
99. 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.
100. Kieffer B L, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth C G: The δ -opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 12048-12052, 1992.
101. Kikui Y, Miki A: A differential staining method for Adenohypophyseal Cells. *Arch. Histol. Cytol.*, 58: 375-378, 1995.
102. Kikuyama S, Yamamoto K, Seki T: Prolactin and its role in growth, metamorphosis and reproduction in amphibians. *Gunma Symp. Endocrinol.* 17: 3-13, 1980.
103. Kilpatrick D, Howells R, Lahm H M, Udenfriend S: Evidence for a proenkephalin-like precursor in amphibian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 5772-5775, 1983.
104. Kilpatrick D, Wahlstrom A, Lahm H M, Blacher R, Udenfriend S: Rimorphin, a unique, naturally occurring (Leu) enkephalin-containing peptide found in association with dynorphin and alpha-neo-dynorphin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6480-6483, 1982.
105. Kosterlitz H: Possible physiological significance of multiple endogenous opioid agonists. En: R F Ber, E G Basset (Eds). *Mechanisms of Pain and Analgesic Compound*. Raven Press, N. Y., 207-214, 1979.
106. Kosterlitz HW, Waterfield AA. *In vitro* models in the study of structure-activity relationships of narcotic analgesics. *Ann. Rev Pharmacol. Toxicol.* 15:29-47, 1975.

107. Kuhn E R, Darras M, Verlinden T M: Annual variations of thyroid reactivity following thyrotropin stimulation and circulating levels of thyroid hormones in the frog *Rana ridibunda*. Gen. Comp. Endocrinol., 57: 266-273, 1985.
108. Lahiti: Properties of a selective agonist, U-50,488H. Life Sci., 31: 2257, 1982.
109. Larras-Regard E, Taurog A, Dorris M: Plasma T4 and T3 levels in *Ambystoma tigrinum* at various atages of metamorphosis. Gen. Comp. Endocrinol., 43: 443-450, 1981.
110. Larras-Regard E, Taurog A, Dorris M: Effects de la TSH exogène sur l'activité thyroïdienne des Amphibiens adultes ou néoténiques. C.R. Soc. Biol., 176: 795-803, 1982.
111. Larras-Regard E: Hormonal determination of neoteny in facultative neotenic urodeles. En *Metamorphosis*. Balls M, Bownes (Eds). Clarendon Press. Oxford, pp. 294-312, 1985.
112. Leander J P: A kappa opioid effect increased urination in the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244: 89-94, 1983.
113. Leboulenger F, Charnay Y, Dubois P, Rossier J, Vaudry H: Presence of proenkephalin in chromaffin cells of the frog adrenal gland. Neurochem. Int., 6: 773-777, 1984.
114. Lee N M, Smith A P: A protein-lipid model of the opioid receptor. Life Sci., 26: 1459-64, 1980.
115. León-Olea M, Sánchez-Alvarez M, Piña A L, Briones Velasco M, Bayón A: Distribución morfológica de leu-encefalina y β -endorfina en la hipófisis del axolotl *Ambystoma mexicanum*. XXIX Congreso Nal. de Ciencias Fisiol. Guanajuato, Gto., del 17 al 20 de Agosto de 1986.
116. León-Olea M, Sánchez-Alvarez M, Briones M, Martínez Servín M: Existencia de inmunorreactividad a leu-encefalina en neuronas de caracol de jardín *Helix aspersa*. XXX Congreso Nal. de Ciencias Fisiol. Jalapa, Ver., del 26 al 30 de julio de 1987.
117. León-Olea M, Sánchez-Alvarez M, Piña A L, Briones M, Bayón A: Enkephalin, endorphin and dynorphin immunoreactive cells and fibers in the pituitary of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. 19 th Annual Meeting Society for Neuroscience. Phoenix, Arizona, Oct. 29-Nov. 3, 1989.
118. León-Olea M, Sánchez-Alvarez M: Distribución de la inmunorreactividad de la Leu-encefalina en la hipófisis del anfibio *Ambystoma tigrinum*: en el estado larvario y en el de adulto o salamandra. Cuartas Jornadas de Biología del desarrollo. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.M. Méx. D.F., del 12 al 14 de Junio de 1991.

119. León-Olea M, Sánchez-Alvarez M, Camacho F: Estudio comparativo de la distribución de la inmunorreactividad a péptidos opioides en la hipófisis de los *Ambystoma mexicanum*, *A. tigrinum* y en la *Salamandra tigrinum*. XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Colima, Col. 8-12 septiembre de 1991.
120. León-Olea M, Sánchez-Islas E, Pellicer F, Sánchez-Alvarez M, Rocha L: Ontogenic changes in the anatomical distribution of leu-enkephalin in the adenohypophysis of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Soc. Neurosci. Washington, DC 1993.
121. Leroith D, Liotta A, Roch J, Shiloach J, Lewis M, Pert C, Kreiger D: Corticotropin and β -endorphin like materials are native to unicellular organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 2086-2090, 1982.
122. Leung M K, Stefano G B: Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 955-958, 1984.
123. 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.
124. Li S, Zhu J, Chen C, Chen Y-W, Deriel J K, Ashby B, Liu-Chen L Y: Molecular cloning and expression of rat κ opioid receptor. Biochem J, 295: 629-633, 1993.
125. Lightman S L, Ninkovic M, Hunt S P, Iversen L: Evidence for opiate receptors on pituicytes. Nature, London, 305: 235-237, 1983.
126. Lindberg I, White L: Reptilian enkephalins: Implications for the evolution of proenkephalin. Arch. Biochem. Biophys, 246: 1-7, 1986.
127. Lord J A H, Waterfield A A, Hughes J, Kosterlitz H: Endogenous opioid peptides multiple agonists and receptors. Nature, London, 267: 495-499, 1977.
128. Maderdrut J L, Merchenthaler I, Sundberg D K, Okado N, Oppenheim R W: Distribution and development of proenkephalin-like immunoreactivity in lumbar spinal cord of the chicken. Brain Res., 1986.
129. Mansour A, Fox C A, Akil H, Watson S: Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. TINS, 18 (1): 22-29, 1995.
130. 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.
131. Martens G, Herbert E: Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. Nature, London, 310: 251-254, 1984.

132. Martin R, Voigt K H: Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin nerve terminals of rat neurohypophysis. *Nature, London*, 289: 502-504, 1981.
133. 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.
134. Martin W R: Pharmacology of opioids. *Pharmacol. Rev.*, 35: 285-323, 1983.
135. Mayer D, Liebeskind J: Pain reduction by local electrical stimulation of the brain. An anatomical and behavioural analysis. *Brain Res.*, 68: 73-93, 1974.
136. Meites J, Bruni J F, van Vugt D A, Smith A F: Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions. *Life Sci.*, 24: 1325-1336, 1979.
137. Mendelsohn G, D'Agostino R, Eggleston J C, Baylin S B: Distribution of β -endorphin immunoreactivity in normal human pituitary. *J. Clin. Invest.*, 63: 1297-1301, 1979.
138. Meng F, Guo-Xi X, Thompson R C, Mansour A, Goldstein A, Watson S J, Akil H: Cloning and pharmacological characterization of a rat κ opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9954-9958, 1993.
139. Merchenthaler I, Lázár G, Maderdrut J L: Distribution of proenkephalin-derived peptides in the brain of *Rana esculenta*. *J. of Comp. Neurol.*, 281:23-39, 1989.
140. Mikami S: Hypophysis. En: *Atlas of Endocrine Organs. Vertebrates and Invertebrates*. Matsumoto A, Ishii S (Eds). (Japanese Society for Comparative Endocrinology and Springer-Verlag, Germany). pp. 39-62, 1992.
141. Minami M, Hosoi Y, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Katsumata S, Yabuuchi K, Onogi T, Satoh M: *In situ* hybridization of κ -opioid receptor mRNA in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, 162: 161-164, 1993.
142. 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.
143. 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.
144. Morel G, Pelletier G: Endorphinic neurons are contacting the tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the rat brain. *Peptides*, 7: 1197-1199, 1986.

145. Munro A F: The ammonia and urea excretion of different species of amphibian during their development and metamorphosis. *Biochem. J.*, 54:29-36, 1953.
146. 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*, London, 278: 423-427, 1979.
147. Ninkowic M, Hunt S P, Emson P, Iversen L L: The distribution of multiple opiate receptors in bovine brain. *Brain Res.*, 214: 163-167, 1981.
Niinuma K, Tagawa M, Hirano T, Kikuyama S: Changes in tissue concentrations of thyroid hormones in metamorphosing toad larvae. *Zool. Sci.* 8: 345-350, 1991.
148. 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*, London, 295: 202-206, 1982.
149. Norman M F: A practical method for staging metamorphosis in the tiger salamander *Ambystoma tigrinum*. *Anat. Rec.* 211: 102-109, 1985.
150. Norris D O, Hormonal and enviromental factors involved in the determination of neoteny in urodeles. En: *Comparative Endocrinology*. Gaillard P J, Boer H H, (Eds), (Elsevier North-Holland, Amsterdam) pp. 109-112, 1978.
151. Norris D O, Jones R E, Criley B B: Pituitary prolactin levels in metamorphosing salamanders. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 20: 437-442, 1973.
152. Norris D O, Platt J E: Effects of pituitary hormones, melatonin, and thyroidal inhibitors on radioiodide uptake by the thyroid glands of larval and adult tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum* (Amphibia: Caudata). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 21: 368-376, 1973.
153. Norris D O, Platt J E: T3 and T4 induced rates of metamorphosis in immature and sexually mature larvae of *Ambystoma tigrinum* (Amphibia: caudata). *J. Exp. Zool.*, 189: 303-310, 1974.
154. Norris D O, Gern W A, Greendale K: Diurnal and seasonal variations in thyroid function of neotenic tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 45: 134-137, 1981.
155. Norris D O, Carr J A, Desan P H, Smock T K, Norman M F: Monoamines and their metabolites in the amphibian (*Ambystoma tigrinum*) Brain: Quantitative Changes during metamorphosis and captivity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103A (2): 279-283, 1992.
156. Olivereau M, Vandesande F, Boucique E, Ollivier F, Olivereau J M: Immunocytochemical localization and spatial relation to the adenohipophysis of a somatostatin-like and a corticotropin-releasing factor-like peptide in the brain of four amphibian species. *Cell Tissue Res.*, 247: 317-324, 1987.

157. Olson G A, Olson R D, Kastin A J: Endogenous opiates 1987. *Peptides*, 10: 205-236, 1989.
158. Olson G A, Olson R D, Kastin A J: Endogenous opiates 1993. *Peptides*, 15: 1513-1556, 1994.
159. Osborne H, Holtt U, Herz A: Potassium induced release of enkephalins from rat striatal slices. *Eur. J. Pharmacol.*, 48: 219-221, 1978.
160. 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.
161. Pasternak G W: High and low affinity opioid binding sites relationship to mu and delta receptors. *Life Sci. USA*, 31: 1303-6, 1982.
162. Pasternak G W, Snyder S H: Identification of novel high affinity opiate receptor binding in rat brain. *Nature, London*, 253: 563-565.
163. Paterson S J, Robson L E, Kosterlitz H W: Classification of opioid receptors. *Br. Med. Bull.*, 39: 31-6, 1983.
164. Pehlemann F W: Funktionsmorphologie der Adenohypophyse. *Prog. Zool.*, 22:204-227, 1974.
165. Pellicer F, Asai M, León-Olea M, Sanchez-Alvarez M: In vitro release of immunoreactive Met- and Leu-enkephalins in whole perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*: *Comp. Biochem. Physiol.*, 104 C(2): 323-325, 1993.
166. Pert C, Aposhian D, Snyder S: Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. *Brain Res.*, 75: 356-561, 1974.
167. Pert C, Snyder S: Opiate receptor demonstration in nervous tissue. *Science*, 179: 1011-1014, 1973.
168. Pert K A, Kuhar M J, Snyder S H: Autoradiographic localization of the opiate receptor in the rat brain. *Life Sci.*, 16: 1849-1854, 1975.
169. Peset J L Terapéutica y farmacología en el romanticismo. En Laín-Entralgo (ed) *Historia Universal de la Medicina*. Salvat, Barcelona pp. 331-332, 1973.
170. Pestarino M: Occurrence of beta-endorphine like immunoreactive cells in the neural complex of a protochordate. *Cell. Mol. Biol.* 31: 27-31, 1975.

171. Pezalla P D, Seidah N G, Benjannet S, Crine P, Lis M, Chretien M: Biosynthesis of β -endorphin, β -lipotrophin and putative ACTH-LPH precursor in the frog pars intermedia. *Life Sci.*, 23: 2281-2292, 1978.
172. Platt J E: Effects of ergocornine on tail height spontaneous and induced metamorphosis and thyroidal uptake of 131 I in neotenus *Ambystoma tigrinum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 28: 77-81, 1976.
173. Platt J E, Licause M J: Effects of oxytocin in larval *Ambystoma tigrinum*: Acceleration of induced metamorphosis and inhibition of the antimetamorphic action of prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 41:84-95, 1980.
174. Portoghese P S : Binaltorphimine and nor-binaltorphimine, potent and selective κ opioid receptor antagonists. *Life Sci.*, 40: 1287, 1987.
175. Portoghese P S, Sultana M, Takemori A E: Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide δ opioid receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 146:185- 186, 1988.
176. Prahlad V, Delanney E: A study of induced metamorphosis in the axolotl. *J. Exp. Zool.* 160: 137-146,1965.
177. Pu L-P, Hayes W P, Mill J F, Ghose S, Friedman T C, Loh Y P: Frog prohormone convertase PC2 mRNA has a mammalian-like expression pattern in the central nervous system and is colocalized with a subset of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons. *J. Comp. Neurol.* 354: 71-86, 1995.
178. Regard E: Etude de la glande thyroïde de l'Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Hétérogénéité morphologique et fonctionnelle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 23: 199-211, 1974.
179. Regard E, Taurog A: A comparison of T4 (RIA) and T3 (RIA) levels in spontaneous and TSH-induced metamorphosis in amphibians. *Ann. Endocrinol.*, 38: 20A (Abstract 35), 1977.
180. Reid R L, Yen S S F, Arton H, Fisher D A: Effects of synthetic β -endorphin on release of neurohypophyseal hormones. *Lancet* 2: 1169-1170, 1981.
181. Richter K, Egger R, Negri L, Corsi R, Severini C, Kreil G: cDNAs encoding (d-Ala²)deltorphin precursors from skin of *Phyllomedusa bicolor* also contain genetic information for three dermorphin-related opioid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4836-4839, 1990.
182. Rivier C, Vale W, Ling N, Brown M, Guillemin R: Stimulation *in vivo* of the secretion of prolactin and growth hormone by β -endorphin. *Endocrinology* 100: 238-241, 1977.
183. Ropert 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.

184. Rosenkilde P: The thyroid hormones in amphibia. En: *Hormones and Evolution*. vol 1. Barrington E J W (Ed). (Academic Press, New York). pp. 437-491, 1979.
185. Rosenkilde P, Mogensen E, Centervall G, Jorgensen O S: Peaks of neuronal membrane antigen and thyroxine in larval development of the Mexican axolotl. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 48: 504-514, 1982.
186. Rosenkilde P, Ussing A P: Regulation of metamorphosis. *Progr. Zool.*, 38: 125-138, 1990.
187. Rossier J, Battenberg E, Pittman Q, Bayón A, Koda L, Miller R, Guillemin R, Bloom F: Hypothalamic enkephalin neurones may regulate the neurohypophysis. *Nature, London*, 227: 653-655, 1979.
188. Rossier J, Vargo T M, Minick S, Ling N, Bloom F E, Guillemin R: Regional dissociation of β -endorphin and enkephalin content in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5162-5165, 1977.
189. Rugg 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. USA*, 78: 4635-4638, 1981.
190. Sánchez-Islas E. Estudio inmunohistoquímico de la distribución anatómica de los péptidos opioides en el cerebro del axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Tesis Profesional de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México, 1993.
191. Sánchez-Islas E, Sánchez-Alvarez M, León-Olea M: Presencia de encefalinas en etapas tempranas del desarrollo del axolotl, *Ambystoma mexicanum*: Estudio inmunohistoquímico. *Anales de la LXXIX Reunión Reglamentaria de la Asociación Pediátrica, A.C. Tepoztlán, Mor., México*. pp.71-81, 1994.
192. Sánchez-Islas E, Sánchez-Alvarez M, León-Olea M: Presencia de encefalinas en etapas tempranas del desarrollo del axolotl. *Bol. Soc. Mex. Cien. Fisiol.* año 3, no. 1, pp. 9-14, 1996.
193. Santoro C, Hall L M, Zukin R S: Opioid receptor subtypes in *Drosophila melanogaster*. *Soc. Neurosci. Abs.*, 11: 307, 1985.
194. Schlesinger C: On the ontogenesis of the acetylcholine system in the brain of South African *Xenopus (Xenopus laevis)* Daudin. *J. Hirnforsch*, 22: 543-553, 1981.
195. SchreckenberG M, Jacobson A G: Normal stages of development of axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Dev. Biol.*, 42: 391-400, 1975.

196. 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.
197. Sei C A, Dores R M: Changes in the processing of prodynorphin end products in the substantia nigra during neonatal development. *Peptides*, 11: 89-94, 1990.
198. Sei C A, Richard R, Dores R M: Steady-state levels of prodynorphin-related end-products from the brain of the amphibian, *Xenopus laevis*. *Brain Res.*, 479: 162-166, 1989.
199. Seidah N G, Fournier H, Boileau G, Benjannet N, Rodeau N, Chretien M: The cDNA structure of the porcine pro-hormone convertase PC2 and comparative processing by PC1 and PC2 of the N-terminal glycopeptide segment of porcine POMC. *FEBS Lett.* 310: 235-239, 1992. (a).
200. Seidah N G, Chretien M: Protein and prohormone convertases of the subtilisin family: recent developments and future perspectives. *Trends Endocrinol. Metab.* 3: 133-140, 1992. (b).
201. Seizinger B R, Grimm C, Holt V, Herz A: Evidence for a selective processing of proenkephalin B into different opioid forms in particular regions of rat brain and pituitary. *J. Neurochem.*, 42: 447-457, 1984.
202. Simantov R, Goodman R, Aphosian D, Snyder S H: Phylogenetic distribution of morphin-like peptide "enkephalin". *Brain Res.*, 111: 204-211, 1976.
203. Simon E J, Hiller J M, Edelman I: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ³H-etorphine in rat brain homogenate: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70: 1947-1949, 1973.
204. Simon J, Benythe S, Borsodi A, Szucs M, Wolleman M: Separation of κ -opioid receptor subtype from frog brain. *FEBS.*, 183: 395-397, 1985.
205. Simon J, Szucs M, Benythe S, Borsodia A, Zeman P, Wolleman M: Solubilization and characterization of opioid binding sites from frog *Rana esculenta*. *Brain J. Neurochem.*, 43: 957-963, 1984.
206. 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.
207. Smith H M, Smith R B: *Synopsis of the Herpetofauna of México*. vol I. Analysis of the literature on the mexican axolotl. Eric Lundberg (ed.), Augusta West Virginia, 1971.
208. Sprules W G: The adaptative significance of paedogenesis in North American species of *Ambystoma* (Amphibia; Caudata): an hypothesis. *Can. J. Zool.*, 52: 393-400, 1974.

209. Stefano G B, Kream R M, Zukin R S: Demonstration of stereospecific opiate binding in the nervous tissue of the marine mollusc *Mytilus edulis*. Brain Res., 181: 440-445, 1980.
210. Stefano G B, Scharrer B, Assanah P: Demonstration, characterization and localization of opioid binding sites in the midgut of the insect *Leucopha maderae* (Blattaria). Brain Res., 25: 205-212, 1982.
211. Steiner, Docherty K, Carol R: Golgi/granule processing of peptide hormone and neuropeptide precursors. J. Cell. Biochem., 24: 121-130, 1984.
212. Steiner, Qwinn S, Chan J, Marsh J, Tager: Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins. Annals N.Y. Acad. Sci., 1-16, 1980.
213. Takahashi A, Kawauchi H, Mouri T, Sasaki A: Chemical and immunological characterization of salmon endorphins. Gen. Comp. Endocrinol., 53: 381-388, 1984.
214. Taurog A: Effects of TSH and long-acting thyroid stimulator on thyroid ¹³¹I-metabolism and metamorphosis of the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Gen. Comp. Endocrinol., 24: 257-266, 1974.
215. Terenius L: Stereospecific interaction between narcotic analgesics and synaptic plasma membrane fraction on rat cerebral cortex. Acta Pharmacol. Toxicol., 32: 317-320, 1973.
216. Terenius L, Wahlstrom A: Inhibitor(s) of narcotic receptor binding in brain extracts and cerebrospinal fluid. Acta Pharmacol. Toxicol. 35: (suppl. 1), 55, 1974.
217. Thompson R C, Mansour A, Akil H, Watson S J: Cloning and pharmacological characterization of a rat μ opioid receptor. Neuron, 11: 903-913, 1993.
218. Tramu G, Leonardelli J: Immunohistochemical localization of enkephalins in median eminence and adenohypophysis. Brain Res., 168: 457-471, 1979.
219. Turner R J: Amphibians. En: *Vertebrate Blood Cells*. (Rowlwy A F and Ratcliffe N A, eds.) Cambridge University Press. pp. 130-209, 1988.
220. Uhl G R, Childers S, Pasternak G: An opiate-receptor gene family reunion. TINS, 17 (3): 89-93, 1994.
221. Udenfriend S, Kilpatrick D: Biochemistry of the enkephalin-containing peptides. Arch. Biochem. and Biophys., 221: 309-323, 1983.
222. Unsworth C D, Hughes J, Morley J S: O-sulphated Leu-enkephalin in brain. Nature, London, 295: 519-520, 1982.

223. Van Leeuwen F W, Pool C W, Sluiter A A: Enkephalins immunoreactivity in synaptoid elements on glial cells in the rat neural lobe. *Neuroscience*, 8 : 229-241, 1983.
224. Van Vugt D A y Martens J: Influence of endogenous opiates on anterior pituitary function. *Fed. Proc.* 39:2533-2538, 1980.
225. Van Wimersma Greidanus T B, Thody I J, Verspaget H, De Roth G A, Goedermans H J H, Croset G y Van Ree J M: Effects of morphine and β -endorphine on basal and elevated plasma levels of alpha MSH and vasopressin. *Life Sci.* 24: 579-586, 1979.
226. Van Wimersma Greidanus T B, Van Ree J M, Van Dam A F, Andringa-Bakker E A D y De Wird D: Effects of β -endorphin fragment on plasma levels of vasopressin. *Life Sci.* 29: 783-788, 1981.
227. Vaudry H, Jenks B, Oberbeeke U: Biosynthesis processing and release of pro-opiomelanocortin related peptides in the intermediate lobe of the pituitary gland of the frog *Rana ridibunda*. *Peptides*, 5: 905-912, 1984.
228. Velasco J M: Descripción metamorfosis y costumbres de una especie nueva del género *Siredón*. Encontrado en el Lago de Santa Isabel, cerca de la Villa de Guadalupe Hidalgo, Valle de México. *Periódico Científico de la Soc. Mex. de Hist. Nat.*, 4: 209-233, 1879.
229. Vindrola O, Briones R, Asai M, Fernández-Guardiola A: Amygdaloid Kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 24:39-43, 1981.
230. Vindrola O, Lindberg I. Biosynthesis of the Prohormone Convertase mPC1 in AtT-20 Cells. *Molecular Endocrinology*. 6 (7): 1088-1094, 1992.
231. Wang J B, Imai Y, Eppler C M, Gregor P, Spivak C E, Uhl G R: μ opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 10230-10234, 1993.
232. Watson S J, Akil H: Alpha-MSH in rat brain occurrence within and outside brain β -endorphin neurons. *Brain Res.*, 182: 217-223, 1980.
233. Watson S J, Akil H, Ghazarossian V E, Goldstein A: Dynorphin immunocytochemical localization in brain and peripheral nervous system preliminary studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1260-1263, 1981.
234. Watson S J, Akil H, Richard III C W, Barchas J: Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature, London* 275: 226-228, 1978.
235. Watson S J, Akil H, Sullivan S O, Barchas J D: Immunocytochemical localization of methionine-enkephalin. Preliminary observations. *Life Sci.*, 25: 733-738, 1977.

236. Watson S J, Akil H, Fischli W, Goldstein A, Zimmerman E, Nilaver G, van Wiemersma Greidanus T B: Dynorphin and vasopressin: Common localization in magnocellular neurons. *Science*, 216: 85-87, 1982.
137. 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. USA*, 80: 891-894, 1983.
238. 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.
239. Weber G M, Farrar E S, Tom C K F, Grau E G: Changes in whole-body thyroxine and triiodothyronine concentration and total content during early development and metamorphosis of the toad *Bufo marinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 94: 62-71, 1994.
240. Weichert C, Presch W: *Elementos de anatomía de los cordados*. Mc. Graw. Hill., 1981.
241. Weil M R: Changes in plasma thyroxine levels during and after spontaneous metamorphosis in a natural population of the green frog, *Rana clamitans*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 62:8-12, 1986.
242. Weitzman R C, Fisher D A, Miniek S, Ling N y Guillemin R: β -endorphin stimulates secretion of arginine vasopressin *in vivo*. *Endocrinol.* 101: 1643-1646, 1977.
243. Yang H, Hexum T, Costa E: Opioids in adrenal gland. *Life. Sci.*, 27: 1119-1125, 1980.
244. Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bekk G L: Cloning and function comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:6736-6741, 1993.
245. Zakarian S, Smyth D G: Distribution of β -endorphin related peptides in rat pituitary and brain. *Biochem. J.*, 202: 261-271, 1982.
246. Zamir N: On the origin of Leu-enkephalin and Met-enkephalin in the rat neurohypophysis. *Endocrinology*, 117: 1687-1692, 1985.
247. Zamir N, Palkovits M, Weber E, Mezey E, Brownstein M J: A dynorphinergic pathway of Leu-enkephalin production in rat substantia nigra. *Nature, London*, 307: 643-645, 1984.
248. 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.
249. Zukin: Naltrexone-induced opiate receptor supersensitivity. *Brain Res.* 245:285, 1982.

Evidence for Enkephalin- and Endorphin-Immunoreactive Cells in the Anterior Pituitary of the Axolotl *Ambystoma mexicanum*

MARTHA LEON-OLEA, MARCELA SANCHEZ-ALVAREZ, ANA LUISA PIÑA,
AND ALEJANDRO BAYON

Laboratorio de Histología, División de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calzada México Xochimilco 101, 14370 México (M.L.-O., M.S.-A.); Instituto de Fisiología Celular (A.L.P.) and Instituto de Investigaciones Biomédicas (A.B.), Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-228, 04510, México

ABSTRACT

An immunohistochemical study of opioid peptides in the hypophysis of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*, was carried out with antisera against leu-enkephalin, beta-endorphin, met-enkephalin, and dynorphin A (1-8). We found leu-enkephalin immunoreactivity in some fibers of the neural lobe and the median eminence. In contrast to previous reports on mammals and other vertebrates, we found leu-enkephalin immunoreactivity in many cells scattered throughout the anterior lobe. As in other vertebrates, the beta-endorphin immunoreactivity was present in all the cells of the intermediate lobe and in a few cells of the anterior lobe. Met-enkephalin and dynorphin A (1-8) immunoreactivities were only present in the neural lobe and the median eminence. The presence of leu-enkephalin and beta-endorphin in the anterior lobe suggests that these peptides could be acting as hormones released from the hypophysis of the unmetamorphosed amphibian.

Key words: opioid peptides, immunohistochemistry, dynorphin, hypophysis, amphibian

Opioid peptides have been implicated not only in the codification and modulation of sensory afferent information processes, such as habituation and nociception, but also in systemic and metabolic responses such as stress, learning, and autonomic regulation (see review of Olson et al., '89). The distribution and functional meaning of leu-enkephalin (Leu-E), met-enkephalin (Met-E), beta-endorphin (BE), and dynorphin A (1-8) (DY 1-8) in the hypophysis of several species have been discussed elsewhere (Bloom et al., '77; Rossier et al., '79; Bentley and Wallis, '86). The enkephalins and dynorphin have been found in the neural lobe (NL) of the hypophysis of different organisms (Bayón et al., '80a; Goldstein and Ghazarossian, '80; Cone and Goldstein, '82). The presence of dynorphin and beta-endorphin in the intermediate lobe (IL) has also been reported (Bloom et al., '77; Rossier et al., '77; Fratta et al., '79; Gramsch et al., '79; Goldstein and Ghazarossian, '80; Cone and Goldstein, '82). There is controversial evidence for the existence of dynorphin in the anterior lobe (AL) of various species. Schwenk et al. ('89) reported high concentrations of DY (1-13) in the

AL of the rat. However, Goldstein and Ghazarossian ('80) found only sparse quantities of this peptide in the AL of the rat, and found no evidence for its presence in *Bufo marinus* (Cone and Goldstein, '82). The only existing report of Leu-E in the meta-adenohypophysis is that of Dores et al. ('84) in the lamprey. A recent work, using a radioimmunoassay technique (RIA) (Assai et al., '88), shows that in a neothenic amphibian, the Mexican axolotl—*Ambystoma mexicanum*—the enkephalin content in the hypophysis is significantly higher than that measured in the telencephalon. Biochemical techniques are suitable for assessing the presence of opioid peptides, but they do not give information about their distribution in the cells containing them. Therefore, we carried out an immunohistochemical study of the hypophyseal gland of the axolotl, to determine the localization of cells and fibers immunoreactive (IR) to Leu-E, Met-E, BE, and DY. Moreover, since the adenohypophysis has a prominent peptide secretory activity, it may prove interest-

Accepted November 23, 1990.

ing to study the features and the distribution of the cells containing these opioid peptides, which may be playing a hormonal function.

MATERIALS AND METHODS

Axolotls, *A. mexicanum*, were captured in the Lake of Xochimilco in Mexico City. Thirty male and female animals, weighing 80–120 g and measuring .18–.20 m in length, were maintained in an open air aquarium at 18–20°C and subjected to an artificial day-night cycle (10 hours light/14 hours darkness). The animals were anaesthetized by inhalation of ethyl-ether and intracardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4, 4°C). The brains, with their hypophyses attached, were removed and post-fixed for 3 hours in the same solution. Then, the brains were equilibrated in successive sucrose solutions (12, 16, and 18%). Brains were cut in sagittal sections (10 µm) by means of a cryostat (Leitz, Wetzlar) at 16–18°C. Sections were mounted on gelatin-covered slides.

Antibody characteristics

Leu-E, Met-E, BE, and DY (1-8) antisera were used for the immunocytochemical experiments. The characteristics of the antisera were as follows. Under RIA conditions, the Leu-E antiserum crossreacts 6%, in a molar basis, with Met-E; 1.4% with DY (1-13); and less than 0.01% with alpha, gamma, and BE. Under immunohistochemical conditions the Leu-E antiserum crossreacts completely with synthetic Leu-E, slightly with synthetic Met-E and DY (1-8), and not at all with BE. Under RIA conditions, the Met-E antiserum showed a 100% crossreactivity with Met(o)-E, 0.3% with Leu-E, 0.2% with the heptapeptide Met-E-Arg-Phe, and less than 0.01% with Met-E-Arg, DY (1-13), DY(1-8), the octapeptide Met-E-Arg-Gly-Leu, alpha, gamma, and BE (Assai et al., '88). Immunohistochemically, this antiserum crossreacted completely with synthetic Met-E, slightly with synthetic Leu-E, and not at all with BE and DY. We used two kinds of BE antiserum: one was kindly supplied by Dr. Floyd Bloom and its radioimmunoassay characteristics have been described elsewhere (Bloom et al., '77), and the other was from a commercial brand (ICN Lab.). These antisera only recognize the carboxyl-terminal segment of the peptide, fully crossreacting with (B-LPH); no cross reaction is observed with pro-enkephalin A (Pro-Enk-A) or pro-enkephalin B (Pro-Enk-B) -derived peptides. Immunohistochemically, both antisera behaved in a similar way, i.e., they crossreacted completely with synthetic BE and they did not crossreact at all with synthetic Leu-E, Met-E, or DY. We used two kinds of dynorphin A (1-8) antiserum: one was kindly supplied by Dr. Iadarola and has been described elsewhere (Iadarola et al., '86; Ruda et al.,

TABLE 1. Cross-reactivity of the Antisera^a

Antisera	Peptides			
	Leu-E	BE	Met-E	DY (1-8)
Anti-Leu-E	+	++++	+++	+++
Anti-BE	++++	+	++++	++++
Anti-Met-E	+++	++++	+	++++
Anti-DY (1-8)	+++	+++	+++	+

^aChanges in the immunofluorescence intensity in tissue sections due to the cross-reactivity of the antisera. The crossreactivity of each antiserum was tested with an excess (10^{-4} M) of its respective homologous synthetic peptide and with other synthetic opioid peptides. Intensity levels: (++++) maximum immunofluorescence, (++++) slight blockage of the immunofluorescence, (++) total blockage of the immunofluorescence.

'88), and the other was from a commercial brand (Peninsula Lab.). Under immunohistochemical conditions, these antisera crossreacted completely with synthetic DY (1-8), slightly with synthetic Leu-E, and not at all with Met-E or BE. The results of preadsorbing the antisera with synthetic peptides are summarized in Table 1.

IMMUNOHISTOCHEMICAL PROCEDURE

The consecutive serial sections were incubated in each one of the antisera at 4°C under a humid atmosphere for 24 hours, diluted in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.3% Triton X-100. The dilutions for each antiserum were Leu-E 1:100, Met-E 1:100, BE 1:50, and DY (1-8) 1:500. Five or six slides in each experiment were chosen for the preadsorption controls: that is, instead of the first antiserum a preadsorbed antibody with its respective synthetic peptide (the synthetic peptide had a concentration of 10^{-4} M) was used, and the following steps of the control experiments were the same as for the normal ones. Thus, after rinsing in PBS, the slides were incubated with a second antibody (goat antirabbit fluorescein isothiocyanate conjugate 1:100) in PBS-Triton for 2 hours at 37°C, rinsed again with PBS, and coverslipped with glycerine. The control experiments were performed as follows: 1) omission of primary antibody, 2) omission of the secondary antibody, 3) preadsorption of primary antibody with an excess, 10^{-4} M, of the respective synthetic peptide (Leu-E, Met-E, BE, and DY (1-8)), 4) control with buffer; i.e., in all the incubation steps only the buffer was used. The structures in which fluorescence was not observed after absorption in the control sections were considered specifically positive. The observations were made in a fluorescence microscope (Leitz Laborlux 12) using suitable filters (I2). Photomicrographs were taken using a 400 ASA film and the usual developing procedures were followed.

RESULTS

Leu-E immunoreactivity

Our results showed intense Leu-E-IR cells scattered throughout the anterior lobe of the hypophysis (Fig. 1A). The median eminence also presented a full pattern of Leu-E-IR fibers (Fig. 1E, arrow). These fibers were located along the same axis of the median eminence and presented varicosities. In the neural lobe we found a low density of IR Leu-E fibers. The cells in the anterior lobe had a columnar shape, their longest axis being 32–40 µm and the shortest one being 6–10 µm. The cells had one pole attached to a sinusoid wall (Fig. 2A), and their elongated nucleus (20 × 4 µm) lay at the opposite pole. Sometimes both poles were

Abbreviations

AL	anterior lobe
BE	beta-endorphin
DY (1-8)	dynorphin A (1-8)
HYP	hypothalamus
I	infundibulum
IL	intermediate lobe
Leu-E	leucine enkephalin
ME	median eminence
Met-E	methionine enkephalin
NL	neural lobe

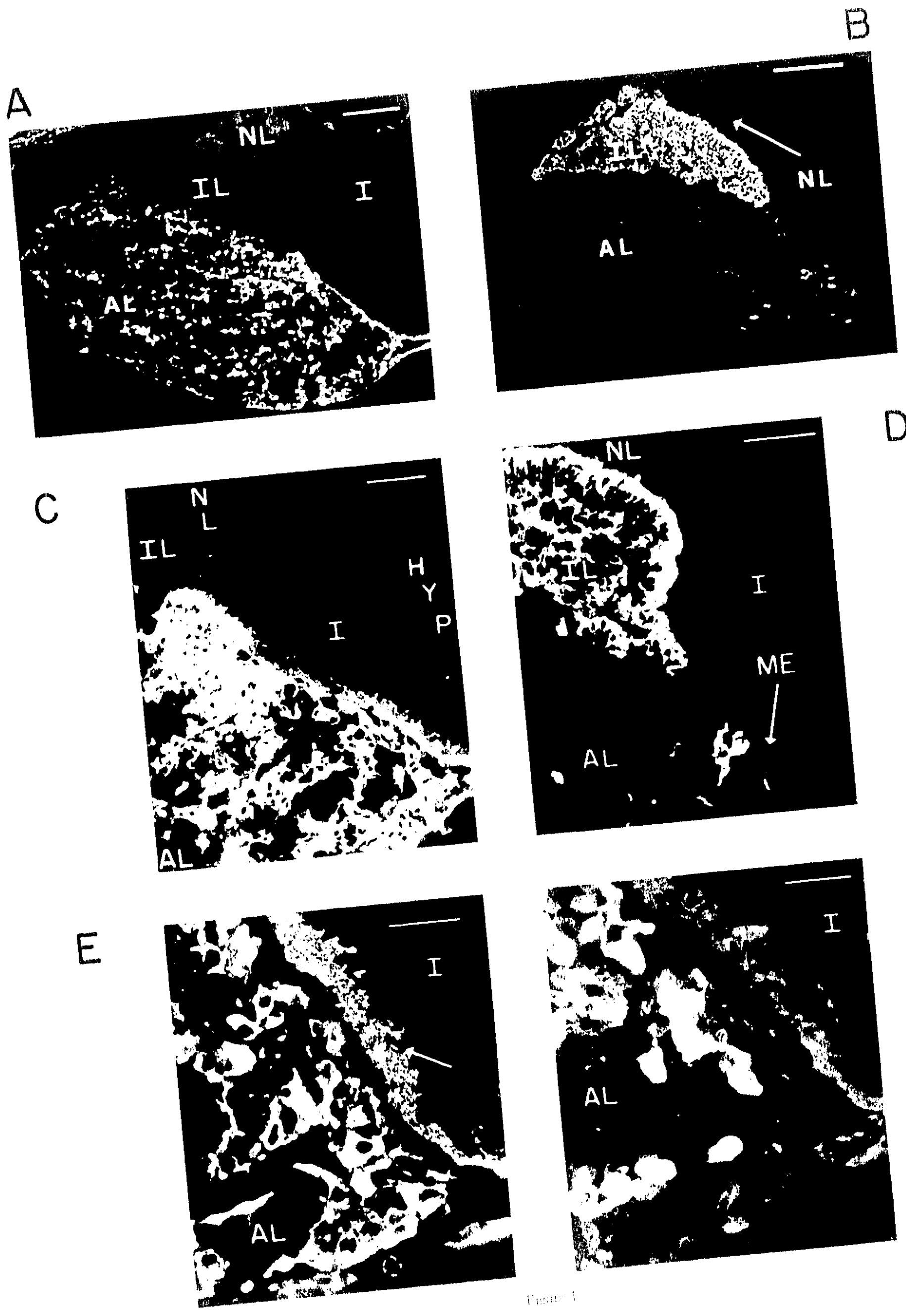


Figure 1

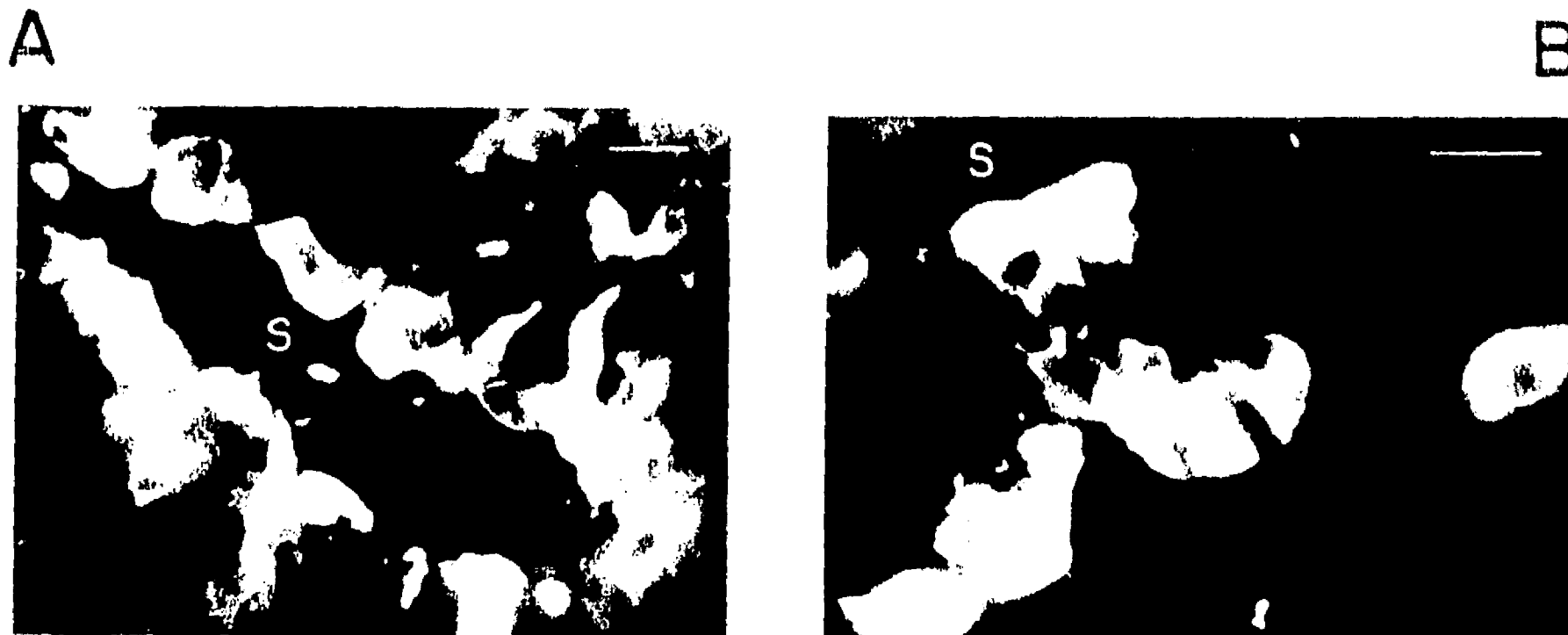


Fig. 2. Parasagittal sections of the hypophysis of the axolotl. **A:** Cells IR to Leu-E in the anterior lobe. **B:** Cells IR to BE in the anterior lobe. Notice the proximity of the IR cells to the sinusoid spaces (S). The cytoplasm of the IR cells are strongly fluorescent, the nuclei are not. Scale bars: A, 50 μ m; B, 25 μ m.

attached to sinusoid walls (Fig. 3). Only the cytoplasm was immunoreactive (Figs. 1E, 2A, 3). No Leu-E-IR-positive cells were found in the intermediate lobe (Fig. 1A,C).

BE immunoreactivity

All cells in the intermediate lobe were found to be immunoreactive to BE (Fig. 1B). In the AL only a few cells showed BE immunoreactivity. The latter cells were distributed in the pedicle (Fig. 1B,F) or were scattered in the rest of the gland. The morphology and size of the BE-IR cells found in the AL were similar to the Leu-E-IR cells described above (Fig. 2B). However, comparison of adjacent sections of the anterior hypophysis having Leu-E and BE immunoreactivities showed that the immunoreactive cells do not overlap (Fig. 4A-D). We had no evidence for colocalization of both peptides in the same cell. However, it is difficult to ascertain the latter observation, since the sections were not counterstained, and hence the cells without immunoreactivity were not clearly seen. Double-labeling studies are needed to confirm this issue. Also no BE-IR cells and fibers in the neural lobe and median eminence were found (Fig. 1B,D,F). An interesting finding was that the BE-IR cells showed a distribution similar to that of corticotropic cells seen with the hematoxylin-eosin staining method. Interestingly, in *Ambystoma tigrinum* the distribution of the corticotropic cells containing ACTH and Alpha-MSH (Dores et al., '89b) resembles that of BE IR cells in *A. mexicanum*.

Met-E immunoreactivity

The Met-E-IR fibers were restricted to the median eminence and some fibers in the neural lobe (Fig. 5A,C). These



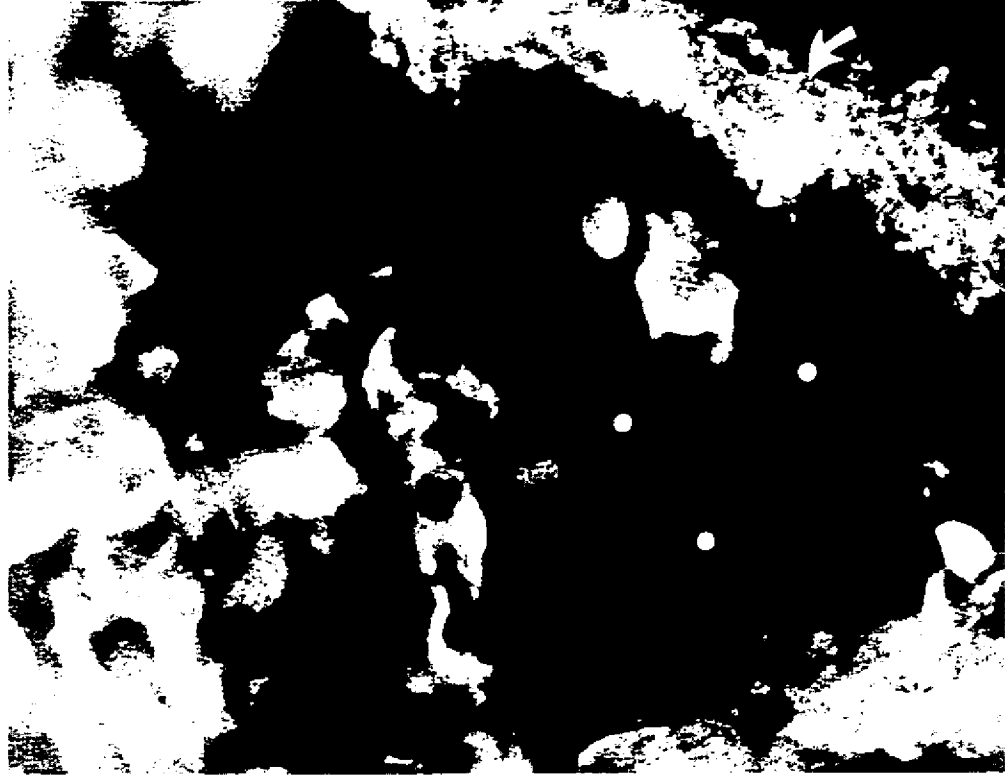
Fig. 3. Cell immunoreactive to Leu-E in the anterior lobe of the hypophysis of the axolotl. An elongated cell with both poles attached to sinusoid walls (S). Scale bar: 50 μ m.

fibers were located along the same axis of the median eminence and showed varicosities. No Met-E-IR cells and fibers were found in the anterior lobe and in the intermediate lobe. Some non-specific and low immunoreactivity was present in the anterior lobe due to crossreactivity to Leu-E. We found also intense Met-E-IR neurons and fibers in the hypothalamus (Fig. 5A,B).

Fig. 1. Parasagittal sections of the hypophysis of the axolotl showing Leu-E and BE immunoreactivities. The three photographs on the left (A,C,E) show immunoreactivity to Leu-E and the ones on the right (B,D,F) to BE. In a panoramic view (A) one can see strong immunofluorescence in many cells of the anterior lobe and in some fibers of the median eminence. There is no immunofluorescence in the intermediate lobe. A higher magnification (C,E) of the anterior region of the

adenohypophysis (pedicle) shows strong immunoreactivity in cells, as well as in fibers of the median eminence. The immunoreactivity to BE is present in all the cells of the intermediate lobe and in some cells of the anterior lobe (B,D). The neural and median eminence do not have immunofluorescence to BE (B,F). Scale bars: A,B, 250 μ m; C,D, 100 μ m; E,F, 50 μ m.

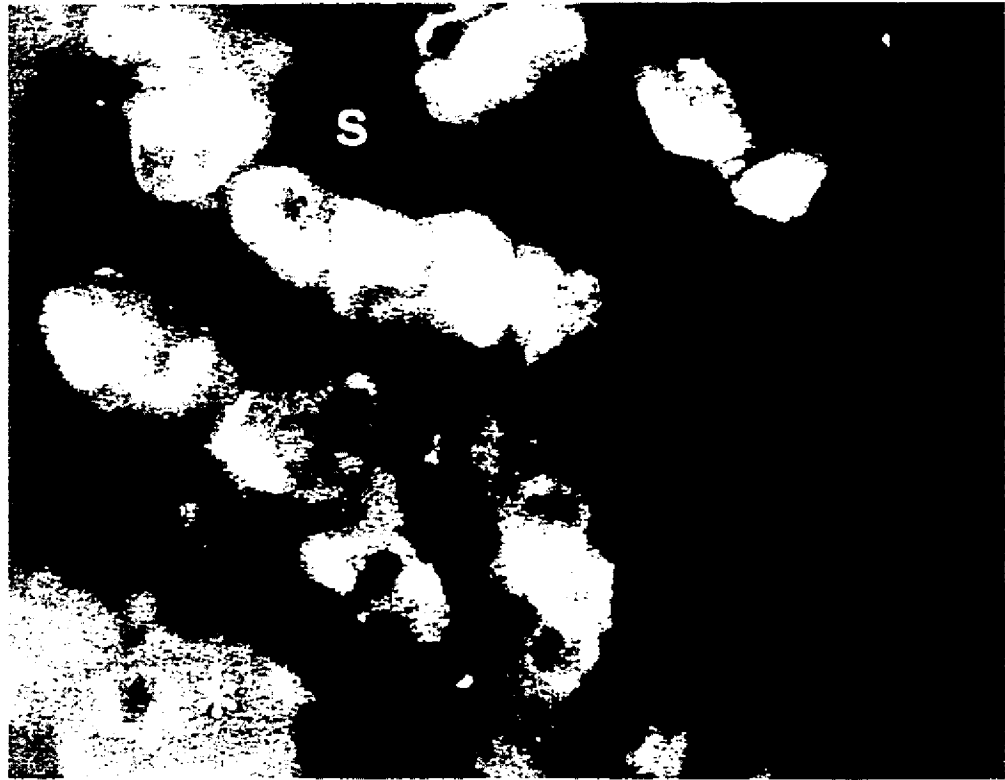
A



B



C



D



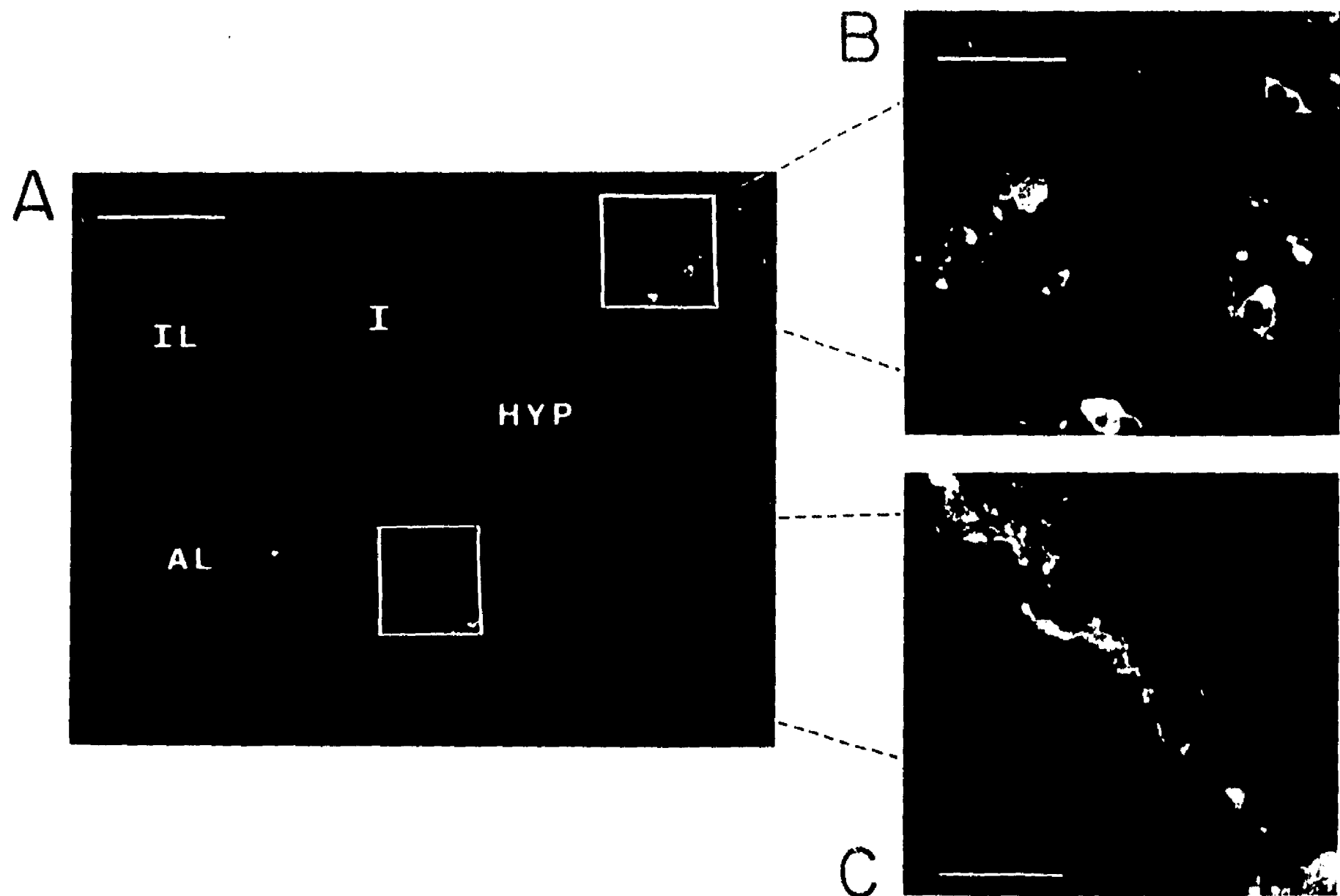


Fig. 5. Parasagittal section of the hypophysis and hypothalamus of the axolotl showing the distribution of immunoreactivity to Met-E. There are many intense IR fibers in the median eminence (see lower boxed area in A, enlarged in C). There is no immunoreactivity in IL and

AL. In the hypothalamus (HYP), there are strongly IR neurons and fibers near the infundibulum (I) (see upper boxed area in A, enlarged in B). Scale bars: A, 200 μ m; B,C, 50 μ m.

DY (1-8) immunoreactivity

The distribution of DY (1-8) immunoreactivity in the hypophysis was very similar to that for Met-E. We found abundant DY (1-8)-IR fibers in the neural lobe and in the median eminence (Fig. 6). No immunoreactivity to DY (1-8) was found in the anterior and intermediate lobes. However, there was a low non-specific fluorescence present in the anterior lobe. We found also DY (1-8)-IR neurons and fibers in the hypothalamus. The distribution of the immunoreactivity to all peptides is shown in Figure 7.

DISCUSSION

Our results show the presence of Leu-E IR cells in the anterior lobe of the hypophysis of *Ambystoma mexicanum*. This pattern of distribution has not been described in other vertebrates. However, Leu-E IR fibers in the NL and ME

are also found in other vertebrate species (Rossier et al., '77; Bayón et al., '80a; Naik et al., '81; Does et al., '89a).

It is remarkable that in the AL we did not find Met-E IR, suggesting that it might arise from a different precursor than Leu-E. There is a low non-specific fluorescence in the AL that can be due to crossreaction of the Met-E antiserum with Leu-E. We discarded the possibility of the presence of Met-E immunoreactivity, because although the Met-E antiserum recognizes Leu-E, using the specific antibody, we did not find any Met-E IR in the AL. However, this does not mean that the antiserum had less affinity, since in the same tissue slices we found fibers in the NL and median eminence, and intense immunoreactive cells and fibers in the hypothalamus.

Since an enkephalin sequence (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) is contained in B-LPH and endorphin (Rossier et al., '77; Nakanishi et al., '79) care has to be taken so that enkepha-

Fig. 4. Adjacent parasagittal sections (15 μ m) showing the lack of overlap between Leu-E and BE immunoreactivities in the anterior lobe of the hypophysis of the axolotl. A: Pedicle region with IR cells (left) and fibers (arrow) to Leu-E. Notice the region with no immunoreactivity in the rostral part of the pedicle (circles). B: Group of IR cells to BE that corresponds to the region with no IR to Leu-E in photograph A. There are no IR fibers in the median eminence (arrow). The asterisk marks

connective tissue present in both photographs that was used as a reference point to compare the sections. C: Leu-E IR cells surrounding a sinusoid (S) in the middle part of the anterior lobe. D: The same sinusoid surrounded by no BE IR cells. The asterisks on both photographs mark an artifact that was used as a reference point for comparison. Photograph D was taken with a long exposure time. Scale bar: 50 μ m

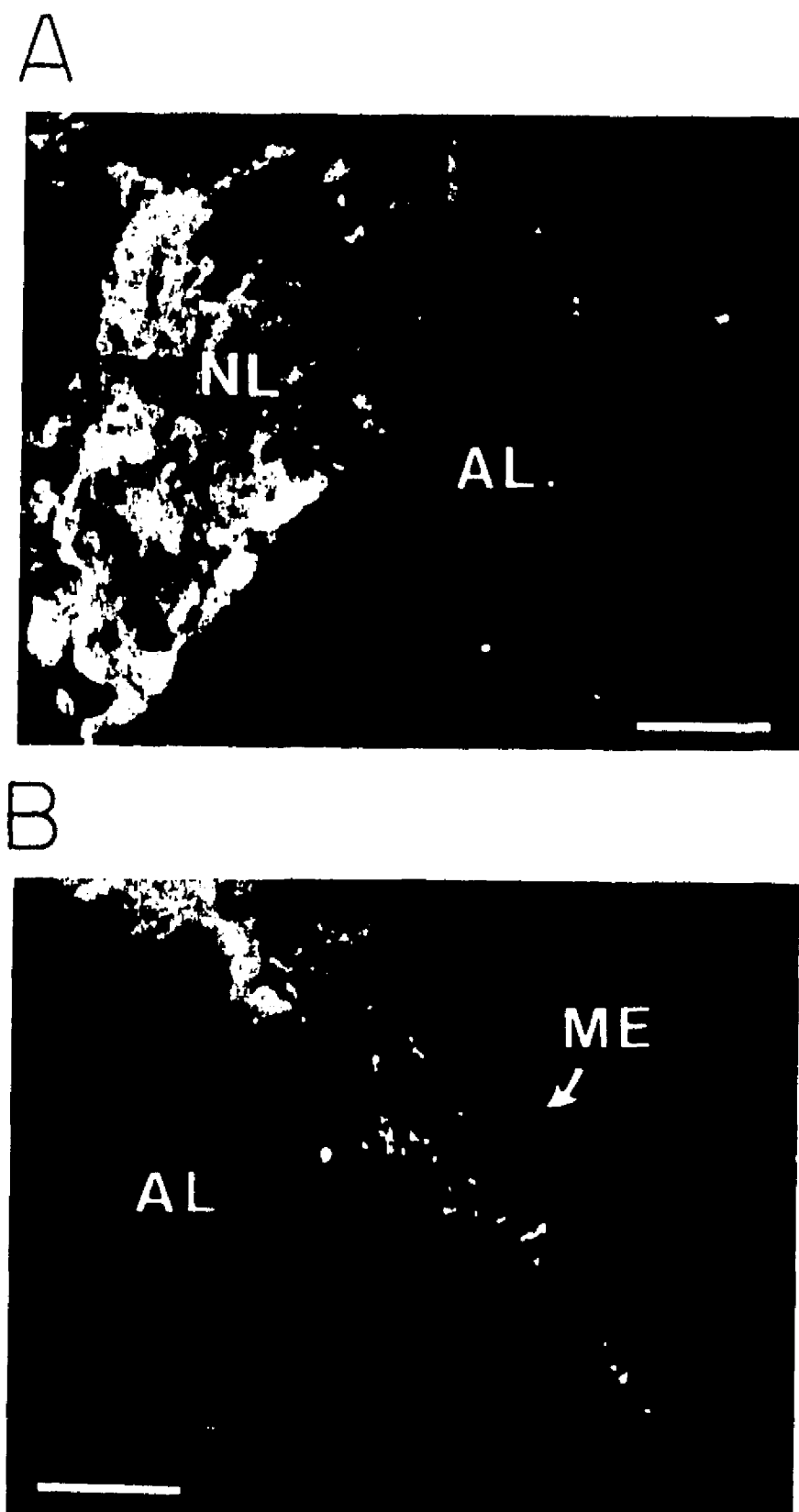


Fig. 6. Photomicrographs showing IR to DY (1-8). There are abundant IR fibers in the neural lobe (A) and in the median eminence (B). Scale bars: A, 10 μ m; B, 50 μ m.

lin IR is not an artifact due to crossreaction with a by-product of B-LPH or endorphin degradation. It is known that the Leu-E sequence is not contained in the B-LPH and endorphin precursor; therefore, the presence of Leu-E immunoreactivity in the anterior lobe of the axolotl is not a degradation product of pro-opiomelanocortin (POMC). A previous study (Dores et al., '84) reports enkephalin immunoreactivity in the meta-adenohypophysis of the lamprey, which coincides with immunoreactive ACTH or alpha MSH. Both products, along with B-LPH and BE, have a common precursor: POMC. Thus, the enkephalin immunoreactivity in the lamprey meta-adenohypophysis may arise from endorphin degradation. Furthermore, the meta-adenohypophysis of this species corresponds with the intermediate lobe of higher vertebrates.

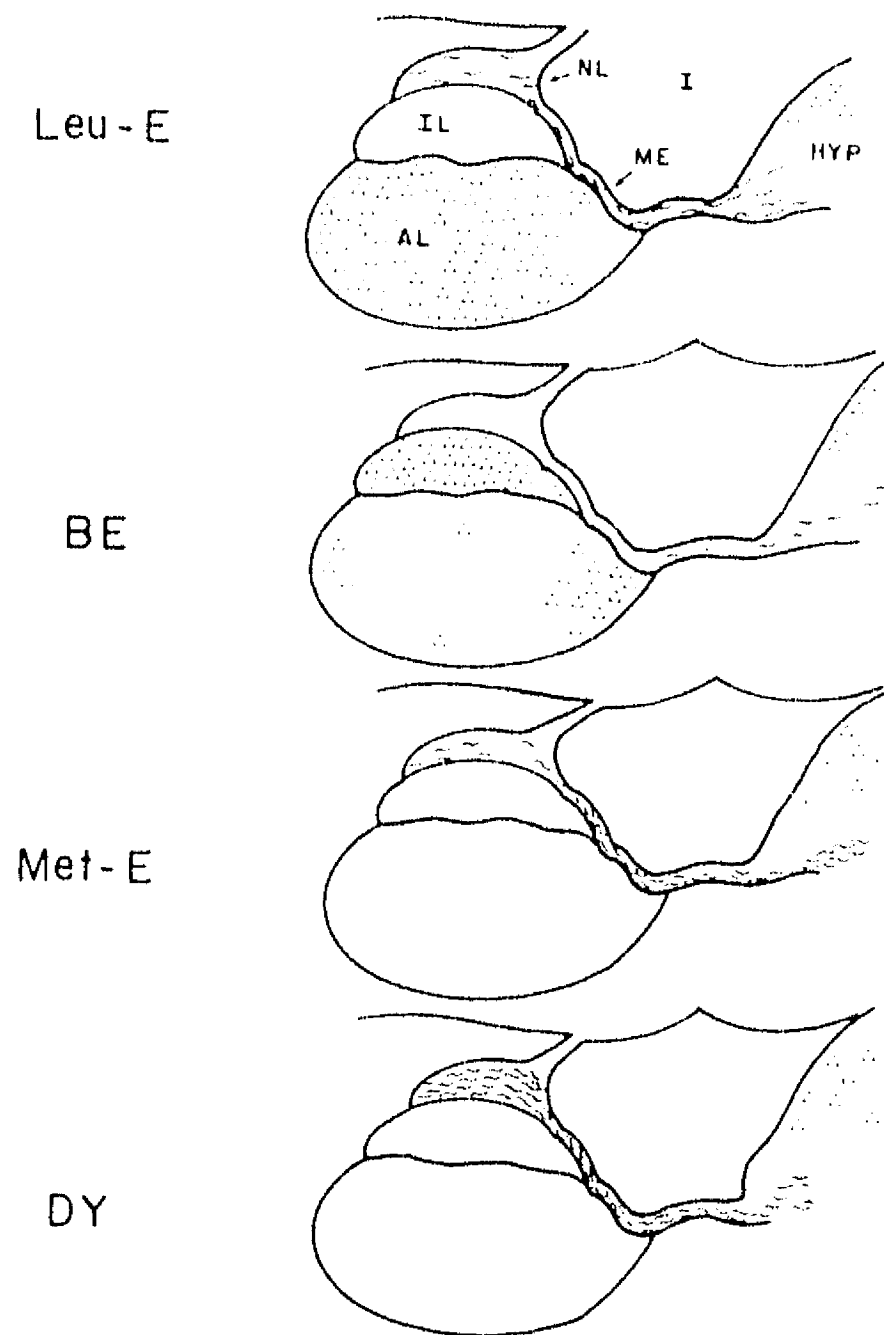


Fig. 7. Drawing of a parasagittal section of the hypophysis of the axolotl summarizing the distribution of IR to Leu-E, BE, Met-E and DY (1-8) cells (Δ) and fibers (\sim).

The peptide Leu-E can be obtained from either of two precursors: pro-enkephalin A or pro-enkephalin B (Comb et al., '82; Gubler et al., '82; Kakidani et al., '82; Noda et al., '82). We believe that in *A. mexicanum* the Leu-E found in the AL comes from the latter precursor. Furthermore, it is possible that Pro-Enk-A genes in lower vertebrates may differ from those present in higher ones. Martens and Herbert ('84) described in *Xenopus laevis* that the genes that codify for Pro-enk-A contain seven Met-E sequences, but no Leu-E. This could also be the case for the axolotl, where the Pro-enk-A may not contain the Leu-E sequence; this peptide may be derived from Pro-enk-B-related end products. In this sense, we could not find DY (1-8)-IR cells in the AL of the axolotl. This could be due to the fact that the antisera used to detect DY (1-8)-related material were directed at mammalian DY (1-8), and therefore were non-specific for amphibian DY (1-8), although we detected DY (1-8) immunoreactivity in fibers in the median eminence, neural lobe, and cells and fibers in the hypothalamus. An alternative explanation is that some of the Pro-Enk-B-related material was cleaved to yield Leu-E. Further studies have to be done with alpha-neo-endorphin or dynorphin B to clarify this point. Conversion of dynorphin products to Leu-Enk has been shown in the amphibian *X. laevis* (Sei et

al., '89). There is also evidence from studies on mammals that Pro-enk-B end products can be processed to yield Leu-E (Zamir et al., '84). Seizinger et al. ('84a,b) found that in rats the low molecular weight components are localized in the NL.

Cone and Goldstein ('82) found that in AL of the toad *Bufo marinus*, there were negligible concentrations of DY. In the rat anterior lobe, the findings are controversial. Schwenk et al. ('87) found high concentrations of DY (1-13), while Goldstein and Ghazarossian ('80) reported low quantities of DY (1-13) in the anterior lobe. Using immunohistochemical techniques, Watson et al. ('81) did not find any immunoreactivity to DY (1-13) in the anterior lobe of the rat. Seizinger et al. ('84b), in an ontogenic study of rats, found that the concentration of pro-enk-B-derived peptides in the AL and IL of the hypophysis is much lower in the newborn animals than in the adults. In our results, the immunoreactivity to DY (1-8) has a similar distribution to Met-E; however, the fibers IR to DY (1-8) in the NL are more abundant. In the IL, our results differ from what has been found in other species (Goldstein and Ghazarossian, '80; Cone and Goldstein, '82). For instance, we did not find DY (1-8) in the IL. The absence of DY (1-8) in the AL and IL of axolotl may be an ontogenic feature, since this amphibian remains in a neotenic state throughout life, that is, it reaches sexual maturity in a larval stage. Thus, the distribution of DY (1-8) might resemble that corresponding to a newborn animal.

The distribution of BE-IR cells is similar to that reported for birds and mammals (Bloom et al., '77, '78; Gramsch et al., '79; Bayón et al., '80a). There are no BE-IR fibers in NL and ME. In AL we do not find coexistence of BE-IR and Leu-E IR cells; this supports the notion that they may come from different precursors. The main distribution of the immunoreactivity in the pedicle of AL coincides with the distribution of the corticotropic cells (Kraicer et al., '85; Olivereau et al., '87; Dores et al., '89b).

The existence of immunoreactivity to Leu-E, Met-E, and DY (1-8) localized in fibers of the median eminence and neural lobe, which come from the hypothalamus, suggests that these peptides might have a regulatory function on the hypophyseal hormones, as has been shown in other species (Rossier et al., '79). The action of BE on hormone responses has been difficult to evaluate; some of the clearest results have been obtained in studies of the AL hormones, growth hormone and prolactin. Many researches in this respect have shown that BE is a very efficient releaser of both hormones at the hypothalamic level (Holaday and Loh, '81). The fact that BE is localized in AL of the axolotl suggests that this peptide behaves as a hormone.

The presence of Leu-E-IR cells in the AL, in contact with the hypophyseal sinusoids, raises interesting questions and possibilities. As Leu-E is very likely secreted as a hormone in the axolotl, which factors might control these cells? Leu-E coexists and is it or is it not cosecreted with other AL hormones? And, which are their physiological targets and functions? The fact that the axolotl reaches adulthood in an immature, non-metamorphosed stage makes the present finding relevant to the study of opioid peptides in relation to developmental biology.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. F.E. Bloom, M. Asai, Dr. M.A. Ruda, and Dr. M.J. Iadarola for kindly providing the antisera. We are grateful to Raúl Cardoso for the elaboration

of the illustrations. We want to express our special gratitude to Dr. Francisco Pellicer for his useful comments and support during the preparation of this manuscript; to Dr. Miguel Condés-Lara and to Dr. F.J. Alvarez-Leefmans for their comments on reading this paper.

This work was partially supported by a research grant from Instituto Mexicano de Psiquiatría (3230 and 3240) and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (P228CCOX891536).

LITERATURE CITED

- Asai, M., A. Cano, E. Talavera, and M. Zubieta (1988) IR-MET and IR-LEU-enkephalin content in the axolotl brain (*Ambystoma mexicanum*). *Neuropeptides* 12:41-42.
- Bayón, A., I. Koda, E. Battenberg, R. Azad, and F.E. Bloom (1980a) Regional distribution of endorphin, met-enkephalin and leu-enkephalin in the pigeon brain. *Neurosci. Lett.* 16:75-80.
- Bayón, A., I. Koda, E. Battenberg, and F.E. Bloom (1980b) 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.
- Bentley, A.M., and M. Wallis (1986) Effects of two enkephalin analogues, morphine sulphate, dopamine and naloxone on prolactin secretion from rat anterior pituitary glands *in vitro*. *J. Endocrinol.* 109:313-320.
- Bloom, F., E. Battenberg, J. Rossier, J.L. Ling, J. Leppaluoto, T.M. Vargo, and R. Guillemin (1977) Endorphins are located in the intermediate and anterior lobes of the pituitary gland, not in the neurohypophysis. *Life Sci.* 20:43-48.
- Bloom, F.E., E. Battenberg, J. Rossier, N. Ling, and R. Guillemin (1978) Neurons containing B-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: Immunocytochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:1591-1595.
- Comb, M., P.H. Seeburg, J. Adelman, L. Eiden, and E. Herbert (1982) Primary structure of the human met- and leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* 295:663, 664.
- Cone, R.L., and A. Goldstein (1982) A dynorphin-like opioid in the central nervous system of an amphibian. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:3345-3349.
- Dores, R.M., T.E. Finger, and M.R. Gold (1984) Immunohistochemical localization of enkephalin and ACTH-related substances in the pituitary of the lamprey. *Cell Tissue Res.* 235:107-115.
- Dores, R.M., L.K. McDonald, and J.W. Crim (1989a) Detection of met-enkephalin and leu-enkephalin in the posterior pituitary of the holostean fish, *Amia calva*. *Peptides (Fayetteville)* 10:951-956.
- Dores, R.M., J.C. Meza, L.M. Schenk, J.A. Carr, and D.O. Norris (1989b) Detection of adrenocorticotropin-related and -melanocyte-stimulating hormone-related substances in the anterior pituitary of larval and adult *Ambystoma tigrinum* (Class: Amphibia). *Endocrinology* 124:1007-1016.
- Fratta, W., H.Y.T. Yang, B. Majane, and E. Costa (1979) Distribution of B-endorphin and related peptides in the hypothalamus and pituitary. *Neuroscience* 4:1903-1908.
- Goldstein, A., and V.E. Ghazarossian (1980) Immunoreactive dynorphin in pituitary and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:6207-6210.
- Gramsch, C., V. Holt, P. Mehraein, A. Pusi, and A. Herz (1979) Regional distribution of methionine-enkephalin and beta-endorphin-like immunoreactivity in human brain and pituitary. *Brain Res.* 171:261-270.
- Gubler, U., P. Seeburg, B.J. Hoffman, L.P. Gage, and S. Udenfriend (1982) Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* 295:206-208.
- Holaday, J.W., and H.H. Loh (1981) Neurobiology of beta-endorphin and related peptides. In Li, C.H. (ed): *Hormonal Proteins and Peptides*. New York: Academic Press, pp. 202-291.
- Iadorola, M.J., C. Shin, J.O. McNamara, and H.Y.T. Yang (1986) Changes in dynorphin, enkephalin and cholecystokinin content of hippocampus and substantia nigra after amygdala kindling. *Brain Res.* 365:185-191.
- Kakidani, H., Y. Furutani, H. Takahashi, H. Noda, Y. Marimato, T. Hirose, M. Asai, S. Inayama, S. Nakanishi, and S. Numa (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine B-neoendorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298:245-249.
- Kraicer, J., T.C. Gajewski, and B.C. Moor (1985) Release of Pro-opiomelanocortin-derived peptides from the pars intermedia and pars distalis of the rat pituitary: Effect of corticotrophin-releasing factor and somatostatin. *Neuroendocrinology* 41:363-373.

- Martens, G.J.M., and E. Herbert (1984) Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. *Nature* 310:251-254.
- Naik, D.R., M. Sar, and W.E. Stumpf (1981) Immunohistochemical localization of enkephalin in the central nervous system and pituitary of the lizard, *Anolis carolinensis*. *J. Comp. Neurol.* 198:583-594.
- Nakanishi, S., A. Inoue, T. Kito, M. Nakamura, A.C. Chang, S.U. Cohen, and S. Numa (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278:423-427.
- Noda, M., Y. Furutani, H. Takahashi, M. Toyosato, T. Hirose, S. Inayama, S. Nakanishi, and S. Numa (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295:202-206.
- Olivereau, M., F. Vandesande, E. Boucique, F. Ollevier, and J.M. Olivereau (1987) Immunocytochemical localization and spatial relation to the adenohypophysis of a somatostatin-like and a corticotropin-releasing factor-like peptide in the brain of four amphibian species. *Cell Tissue Res.* 247:317-324.
- Olson, G.A., R.D. Olson, and A.J. Kastin (1989) Endogenous opiates: 1987. *Peptides (Fayetteville)* 10:205-236.
- Rossier, J., T.M. Vargo, S. Minick, N. Ling, F.E. Bloom, and R. Guillemin (1977) Regional dissociation of B-endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5162-5165.
- Rossier, J., E. Battenberg, Q. Pittman, A. Bayón, L. Koda, R. Miller, R. Guillemin, and F. Bloom (1979) Hypothalamic enkephalin neurones may regulate the neurohypophysis. *Nature* 227:653-655.
- Ruda, M.A., M.J. Iadarola, L.V. Cohen, and W.S. Young III (1988) *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. U.S.A.* 85:622-626.
- Schwenk, M., R. Jackisch, and W. Knebel (1987) Subcellular distribution of dynorphin-like immunoreactivity in rat adenohypophysis in comparison with luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Life Sci.* 41:2403-2409.
- Sci, C.A., R. Richard, and R.M. Doros (1989) Steady-state levels of pro-dynorphin end-products from the brain of the amphibian, *Xenopus laevis*. *Brain Res.* 479:162-166.
- Seizinger, B.R., V. Holtt, and A. Herz (1984a) Proenkephalin B (Prodynorphin)-derived opioid peptides: Evidence for a differential processing in lobes of the pituitary. *Endocrinology* 115:662-670.
- Seizinger, B.R., D.C. Liebisch, C. Grimm, and A. Herz (1984b) Ontogenic development of the pro-enkephalin B (=Pro-dynorphin) opioid peptide system in the rat pituitary. *Neuroendocrinology* 39:414-422.
- Watson, S.J., H. Akil, V.E. Ghazarossian, and A. Goldstein (1981) Dynorphin immunocytochemical localization in brain and peripheral nervous system: Preliminary studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1260-1263.
- Zamir, N., M. Palkovitz, E. Weber, E. Mezey, and J.D. Brownstein (1984) A dynorphinergic pathway of Leu-enkephalin production in rat substantia nigra. *Nature* 307:643-645.

Publicaciones elaboradas durante la realización de la tesis.

León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., Piña A L. and Bayón, A. Evidence for enkephalin and endorphin immunoreactive cells in the anterior pituitary of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. J. Comp. Neurol. 305:412- 420, 1991.

Pellicer F., León-Olea M. y Sánchez-Alvarez M. Consideraciones Sobre las Teorías Moleculares de la Adicción a la Morfina. Salud Mental. 15:(2): 44-48, (1992).

Pellicer F., Asai, M., León Olea, M., and Sánchez-Alvarez, M. In vitro release of IR-Met and IR-Leu- enkephalins in whole perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*. Comp. Biochem. Physiol. 104C (2):323-325, 1993.

Sánchez-Alvarez, M., León-Olea, M., Talavera, E., Pellicer, F., Sanchez-Islas, E., Martínez-Lorenzana, G: Distribution of NADPH-diaphorase in the perioesophageal ganglia of the snail, *Helix aspersa*. Neuroscience Letters 169:51-55, 1994.

León-Olea, M., Sánchez-Alvarez M., Sánchez-Islas, E.: Los opioides como péptidos ancestrales: estudio inmunohistoquímico en el molusco *Helix aspersa* y en el anfibio *Ambystoma mexicanum*. Salud Mental 17 (3): 40-48, 1994.

Talavera, E., Martínez-Lorenzana, G., León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., Sánchez-Islas E., Pellicer F. Histochemical distribution od NADPH-diaphorase in the cerebral ganglion of the crayfish *Cambarellus montezumae*. Neuroscience Letters. 187:177-180, 1995.

Flores A, León-Olea M, Vega R, Soto E: Histochemistry and role of nitric oxide synthase in the amphibian (*Ambystoma tigrinum*) inner ear. Neuroscience Letters., 205: 131-134, 1996.

Artículos científicos no arbitrados

Sánchez-Alvarez, M. y León-Olea M. Variación Estacional de la Inmunorreactividad a Leu-y Met-encefalina en los Ganglios periesofágicos del Caracol *Helix aspersa* . Anales de la VI Reunión de Investigación y Enseñanza del IMP, 92-95, 1991.

Pellicer F., Asai M., León-Olea M., Sánchez-Alvarez M. Liberación in vitro de la inmunorreactividad a Met- y a Leu-encefalinas en el ganglio periesofágico completo del caracol *Helix aspersa*. Anales de la VII Reunion de Investigación y Enseñanza del IMP, 12-15, 1993.

Sánchez-Alvarez, M., León-Olea, M., Talavera, E., Pellicer, F. Sánchez-Islas, E., Martínez-Lorenzana, G. Distribución de la NADPH-Diaforasa en el ganglio periesofágico del caracol *Helix aspersa*. Anales No. 5 de la IX Reunion de Investigación del IMP,163-166, 1994.

Martínez-Lorenzana, G., Talavera-Cuevas, E., León-Olea, M., Condés-Lara, M. Cambios en la velocidad del transporte axonal en las fibras comisurales amigdalinas por el Kindling amigdalino.

Anales No. 6 de la X Reunión de Investigación del IMP, 20-30, 1995.

Artículos de divulgación.

León-Olea M. Los péptidos opioides y la filogenia de la nocicepción. Ciencias no. 31:33-38, Julio 1993.

Capítulos en libros científicos

León-Olea, M. Los péptidos opioides como proteínas ancestrales: Estudio inmunohistoquímico en el molusco *Helix aspersa* y el anfibio *Ambystoma mexicanum*. Péptidos Opioides. Ed. F. Pellicer. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México: 1993 pp.1-13.

Comunicaciones a congresos

León Olea, M., Sánchez Alvarez, M., Piña, A.L., Briones, M. y Bayón, A. Enkephalin, endorphin, and dynorphin immunoreactive cells and fibers in the pituitary of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). 19Th. Annual Meeting Society for Neuroscience. Phoenix, Arizona. Oct. 29-Nov.3, 1989.

León-Olea, M. y Sánchez-Alvarez, M. Distribución de la inmunorreactividad de la Leu-encefalina en la hipófisis del anfibio *Ambystoma tigrinum*: en el estado larvario y en el de adulto o salamandra. Cuartas Jornadas de Biología del desarrollo. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.M. Méx. D.F., del 12 al 14 de Junio de 1991.

León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., Camacho, F. Estudio comparativo de la distribución de la inmunorreactividad a péptidos opioides en la hipófisis de los *Ambystoma mexicanum*, *A. tigrinum* y en la Salamandra *tigrinum*. XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Colima, Col. 8-12 septiembre de 1991.

León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., Camacho, F., Alvarez Leefmans, F.J. Distribution and seasonal variations of the immunoreactivity to Leu-and Met-enkephalins in the perioesophageal ganglia of the snail *Helix aspersa*. 21st Annual Meeting Society for Neuroscience. New Orleans, USA, del 11 al 15 de noviembre de 1991.

Pellicer, F., Asai, M., León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M. In vitro release of IR-Met-enkephalin in a whole perioesophageal ganglion of *Helix aspersa*. 22nd Annual Meeting Society for Neuroscience, Anaheim, California, del 25 al 30 de octubre de 1992.

Sánchez-Alvarez, M., León-Olea, M., Piros, E., Talavera, E., Faull, K.F. Evans, C.J. Characterization of opioid material in the perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*. 22nd Annual Meeting Society for Neuroscience, Anaheim, California, del 25 al 30 de octubre de 1992.

Talavera, E., León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., Omaña-Zapata, I., Martínez-Lorenzana, G., Sánchez-Islas, E., Condés-Lara, M. Aumento en la velocidad de transporte axonal del trazador peroxidasa- aglutinina del germen de trigo (HRP-WGA) en las fibras comisurales amigdalinas de ratas epileptizadas por el "kindling". II Reunion de Investigación de los Institutos Nacionales de Salud, México, D.F., del 11 al 13 de noviembre de 1992.

Sánchez-Islas, E., Martínez-Lorenzana, G., Sánchez-Alvarez, M., y León-Olea, M. Distribución Anatómica de la inmunorreactividad a Leu-y Met-enkefalinas en el telencéfalo, diencéfalo y mesencéfalo del axolotl (*Ambystoma mexicanum*). II Reunión de Investigación de los Institutos Nacionales de Salud, México, D. F., del 11 al 13 de noviembre de 1992.

Sánchez- Islas, E. y León-Olea M. Distribución anatómica de la inmunorreactividad a Leu- y Met-enkefalinas en el Cerebro del Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). VI Congreso Nacional Estudiantil de Investigación en el Area de la Salud, Facultad de Medicina, UNAM. México, D.F. Del 10 al 12 de Marzo de 1993.

Sánchez-Islas, E., Sánchez-Alvarez, M. y León-Olea M. Localización inmunohistoquímica de las enkefalinas en el Sistema Nervioso Central del Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Universidad Americana de Acapulco. Acapulco Gro. Agosto 15-20 de 1993.

Martínez-Lorenzana, G., Talavera, E., Sánchez-Alvarez, M., Sánchez-Islas E., León-Olea M., Pellicer F. Identificación de las neuronas productoras de óxido nítrico en el ganglio cerebroide del acocil, *Cambarellus montezumae*, mediante la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa. XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad de Ciencias Fisiológicas, Universidad Universidad Americana de Acapulco. Acapulco Gro. Agosto 15-20 de 1993.

León-Olea, M., Talavera, E., Sánchez-Alvarez M., Pellicer F. Sánchez-Islas E., Martínez-Lorenzana G. Distribución de las Neuronas Productoras de óxido nítrico en el SNC del axolotl, *Ambystoma mexicanum*. XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad de Ciencias Fisiológicas, Universidad Universidad Americana de Acapulco. Acapulco Gro. Agosto 15-20 de 1993.

León-Olea M., Sánchez-Islas E., Pellicer F., Sánchez-Alvarez M., Rocha L. Ontogenic changes in the anatomical distribution of leu-enkephalin in the adenohypophysis of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Soc. Neurosci. Washington, DC 1993.

Sánchez-Islas E., Sánchez-Alvarez M., Pellicer F., León-Olea M. Immunohistochemical localization of enkephalins in the central nervous sistem of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Soc. Neurosci. Washington, DC 1993.

Sánchez-Alvarez M., León-Olea M., Talavera, E., Pellicer F., Sánches-Islas E.,

Alvarez-Leefmans, J.F., Martínez-Lorenzana G. Distribution of putative nitric oxide producing neurons in perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*. Soc. Neurosci. Washington, DC 1993.

Martínez-Lorenzana G., Talavera E., León-Olea M., Sánchez-Alvarez M., Sánchez-Islas E., Sitges, M., Pellicer F. Distribution of putative nitric oxide in brain of crayfish *Cambarellus montezumae* using NADPH-diaphorase histochemistry. Soc. Neurosci. Washington, DC 1993.

Vega, R., Guevara, J., León-Olea, M., Soto, E. Neurofarmacología e inmunorreactividad a péptidos opioides en el oído interno. XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Montevideo, Uruguay 12-16 de Abril, 1994.

Talavera, E., Martínez-Lorenzana, G. León-Olea, M., Condés-Lara M. Determinación de la velocidad de transporte axonal del Trazador peroxidasa conjugado con la aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA) en ratas epileptizadas. XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A. C. Mérida, Yucatán, 25 al 29 de septiembre 1994. Res. 0190.

Talavera E., Sanchez-Alvarez, M., Martínez-Lorenzana G., Sánchez-Islas, E., León-Olea, M. Pellicer, F., Condés-Lara, M., Omaña, I. Identification of putative nitric oxide producing neurons in amygdala and hippocampus in the electrical kindled rats using NADPH-diaphorase histochemistry. 24 th. annual Meeting Soc. Neurosci. Abs. vol. 20 (part. I) p.p. 410. 1994.

León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., Pellicer, F., Talavera, E. Sánchez-Islas, E., Martínez-Lorenzana, G. Distribution of nitric oxide producing neurons in the CNS of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. 24 th. annual Meeting Soc. Neurosci. Abs. vol. 20 (part. 2) p.p. 1173. 1994.

Sánchez-Islas E, Sánchez-Alvarez M, y León-Olea M. Presencia de encefalinas en etapas tempranas del desarrollo del axolotl, *Ambystoma mexicanum*: Estudio Inmunohistoquímico. LXXIX Reunión reglamentaria de la asociación de investigación Pediátrica. Tepoztlan, Mor., Diciembre 2-4, 1994.

Talavera, E, Martínez-Lorenzana, G., León -Olea, M., Corkidi-Blanco, G., Condés-Lara, M. Identificación de neuronas que sintetizan óxido nítrico en el hipocampo, amígdala y estriado en el kindling amigdalino, mediante la técnica histoquímica para la NADPH-diadorasa. XXXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A. C. Querétaro, Qro. 27 al 31 de agosto de 1995. Res. 063.

Sánchez-Islas, E., Sánchez-Alvarez, M., Pellicer, F., León-Olea, M. Enkephalins in the developing central nervous system of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. 25 th. annual Meeting Soc. Neurosci. Abs. vol 21 (part. 2) p.p.1117. 1995.

Martínez-Lorenzana, G., Talavera, E, León -Olea, M., Condés-Lara, M. and Sitges M. Axonal

transport velocity changes in the amigdaloid kindling. 25 th. annual Meeting Soc. Neurosci. Abs. vol 21 (part. 3) p.p. 2114. 1995.

Soto E, Flores A, León-Olea M, Vega R: Nitric oxide synthase histochemistry and its role in the afferent activity of the amphibian inner ear. Abs. of the 19th Midwinter Research Meeting. Association for Research in Otolaryngology. pp. 173, 1996.

Tesis Dirigidas

Alumno: Eduardo Sánchez Islas. Tesis para obtener el título de Biólogo de la Facultad de Ciencias, Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de México. Con el título: "Estudio inmunohistoquímico de la distribución anatómica de los péptidos opioides en el cerebro del axolotl *Ambystoma mexicanum*". Trabajo desarrollado en el Laboratorio de Histología del Instituto Mexicano de Psiquiatría. Defendida el 7 de octubre de 1993.

Alumno: Guadalupe Martínez Lorenzana. Cotutoría de la tesis para obtener el título de Biólogo de la Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de México. Con el título: "Determinación del transporte axonal del trazador peroxidasa aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA) en las fibras comisurales amigdalinas, en ratas epileptizadas por Kindling". Trabajo desarrollado en el Laboratorio de Histología del Instituto Mexicano de Psiquiatría. Estatus: Defendida el de 1994.

Alumno: Eduardo Sánchez Islas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Fisiológicas. Colegio de Ciencias y Humanidades de la U.A.C.P.y P, Centro de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Créditos 75%. Título de la tesis: Peptidos opioides en el sistema nervioso central del axolotl, *Ambystoma mexicanum*, durante la ontogenia. Trabajo desarrollado en el Laboratorio de Histología del Instituto Mexicano de Psiquiatría.