

La unidad hipotálamo-hipófisis de *Ambystoma mexicanum* y los cambios en la concentración de encefalinas a lo largo de las diferentes etapas de la metamorfosis inducida con tiroxina (T4)

Agustina Cano Martínez,* Miguel Asai Camacho*

Summary

In this work we report the changes in the IR-Met-enkephalin (IR-ME) and IR-Leu-enkephalin (IR-LE) concentration, in the diencephalon and the hypophysis (hypothalamo-hypophysial axis) of *Ambystoma mexicanum* during different stages of the induced metamorphosis. The metamorphosis was induced with a single intraperitoneal injection of 2.5 µg/g of tiroxine (T4).

The changes of the IR-ME concentration in the diencephalon and the hypophysis were opposite during the stages of the metamorphosis. At the end of the process (stage IV), the IR-ME concentration in the hypophysis decreased 50% when compared with the premetamorphic values. In contrast, at the end of the metamorphosis, the control values in the diencephalon, were duplicated. The changes in the IR-LE concentration were parallel in both structures and had a single biphasic pattern. The levels of IR-LE in the diencephalon were elevated at stage I, and in the hypophysis at stage II. However, they decreased 50% at the end of the metamorphosis, when compared with the premetamorphic stage.

These results suggest a relationship between the metamorphosis and the enkephalins of the hypothalamo-hypophysial axis in the *A. mexicanum*. With the reported data we cannot to explain if the changes in the concentration of these opioid peptides involve a relation of cause or effect. However, the evident association of the metamorphosis with the neuroendocrine hypophyso-dependent changes, supports the hypothesis of the interaction of the enkephalins with other chemical messenger in the regulation of the neurohypophysial functions that underline the metamorphosis in the amphibians.

Resumen

En este trabajo se cuantificó la concentración de inmunoreactividad (IR) para encefalinas mediante el método de radioinmunoanálisis en el diencéfalo y la hipófisis (unidad hipotálamo-hipófisis) de *Ambystoma mexicanum* durante las diferentes etapas de la metamorfosis inducida con una inyección intraperitoneal de tiroxina (T4) en una dosis de 2.5 microgramos/g.

Los cambios en la concentración de Met-encefalina (IR-ME) entre el diencéfalo y la hipófisis fueron opuestos a lo largo de la metamorfosis. Al final del proceso (etapa IV), la concentración de IR-ME en la hipófisis descendió en un 50% respecto a los valores premetamórficos. En contraste, al final de la metamorfosis se duplicaron los valores en el diencéfalo, respecto al control. Los cambios en la concentración de Leu-encefalina (IR-LE) fueron paralelos en las dos estructuras, y presentaron un patrón bifásico. La concentración de IR-LE se incrementó en el diencéfalo en la etapa I y en la hipófisis en la etapa II. Posteriormente, en ambas estructuras disminuyeron los valores de IR-LE en un 50% con respecto a los valores premetamórficos.

Nuestros resultados sugieren la existencia de una relación entre la metamorfosis y las encefalinas de la unidad hipotálamo-hipófisis en *A. mexicanum*. Con los datos con que contamos no podemos saber con precisión si los cambios en la concentración de estos péptidos opioides implican una relación causa o efecto. Sin embargo, la clara asociación de la metamorfosis con los cambios neuroendócrinos hipófiso-dependientes, apoyan la hipótesis de que las encefalinas podrían interactuar con

* Investigadores del Laboratorio de Análisis Químicos de la División de Investigaciones en Neurociencias. Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101. Col. San Lorenzo Huipulco, 14370 México, D.F.

otros mensajeros químicos en la regulación de las funciones neurohipofisiarias que subyacen a la metamorfosis de los anfibios.

Introducción

Los resultados sobre la unión estereoespecífica de los opiáceos en las preparaciones membranales de tejido cerebral hizo considerar el significado biológico de los sitios de unión (receptores) en relación con sus ligandos endógenos.³¹ A partir de los extractos cerebrales del cerebro del cerdo, en 1975 se identificaron dos sustancias endógenas con acciones farmacológicas semejantes a las de la morfina.¹⁴ Por su ubicación en el encéfalo se denominaron encefalinas (ENKs).

Las ENKs, la Metionina-encefalina (ME) y la Leucina-encefalina (LE) son dos péptidos de 5 aminoácidos con la siguiente secuencia: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (ME), Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (LE).

Después del descubrimiento de las ENKs se describió un número considerable de péptidos que mimetizan la acción de la morfina y, en conjunto con las ENKs, se les denomina genéricamente "péptidos opioides".^{13,37}

Originalmente, los péptidos opioides y sus receptores se identificaron en el sistema nervioso (SN) de los mamíferos.^{13,14,22,24,37} Sin embargo, hasta la fecha son múltiples las evidencias que indican la universalidad de estos sistemas de mensajeros químicos dentro del reino animal, incluyendo al hombre, ya que se ha hecho evidente su presencia en diferentes tejidos de todas las especies analizadas.^{11,30,35}

Hay evidencias que indican la participación de las ENKs en las funciones de los tejidos donde se encuentran.³³ En los mamíferos se han relacionado principalmente con la regulación del dolor.^{15,16} Se propone que pueden ejercer su acción como neurotransmisores o neuromoduladores.^{13,25,26} También hay evidencias que indican la participación de las ENKs en diferentes procesos neuroendócrinos.²⁷

En algunas especies de anfibios, se ha demostrado la presencia de ENKs en el SNC:^{1,5,16,19,39} en la médula espinal,²¹ en las células cromafines¹⁸ y en las inervaciones del intestino.⁴ En los anfibios urodelos *A. mexicanum*¹ y *A. tigrinum*,⁵ nuestro laboratorio ha reportado diferencias regionales significativas en la concentración de ENKs, principalmente entre la glándula hipófisis y las regiones encefálicas.

La metamorfosis corresponde a un proceso de cambio morfo-funcional durante el ciclo de vida de los anfibios, en el que intervienen procesos neuroendócrinos. En la presente investigación se analizan los cambios en la concentración de ENKs en el diencéfalo y en la glándula

hipófisis (unidad hipotálamo-hipófisis [H-H]) de *A. mexicanum* durante las etapas de la metamorfosis.

El ciclo biológico de la mayoría de los anfibios, comprende dos fases generales de desarrollo: la embriogénesis y la metamorfosis. El desarrollo embrionario culmina con la formación del estado larvario, mismo que mediante metamorfosis se convierte en adulto. La metamorfosis implica cambios morfo-fisiológicos, bioquímicos y conductuales que se acompañan del desplazamiento del organismo hacia el medio terrestre.^{2,10}

Se sabe que en los anfibios, la metamorfosis depende de mecanismos endocrinos en los que participan por lo menos tres órganos de secreción interna: el cerebro, la glándula hipófisis y la glándula tiroideas. En este proceso participan las dos hormonas tiroideas (HT) bioactivas y la tirotropina (TSH).^{10,17} Se ha propuesto un modelo general que considera el mecanismo de regulación hormonal de la metamorfosis en los anfibios anuros, en el cual se incluye la participación de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y de prolactina (PRL).^{2,10} Sin embargo, en los anfibios urodelos, las evidencias sobre la participación de estas dos hormonas son controvertidas.^{8,9,10}

El ciclo de vida de la mayoría de los anfibios incluye la metamorfosis; sin embargo, hay algunas excepciones importantes. Tal es el caso de los anfibios neoténicos, como *Ambystoma mexicanum*, que es una especie neoténica obligada inducible; es decir, que se reproduce conservando su morfología y hábitos larvarios y no se metamorfosea. Sin embargo, en esta especie puede inducirse la metamorfosis de manera experimental mediante la administración de las HT o la TSH.^{10,17}

Se desconocen,^{2,10} los factores que mantienen la neotenia en *A. mexicanum*; sin embargo, para los fines de este estudio, tal característica resulta de gran utilidad, ya que permite analizar el proceso de metamorfosis de manera controlada.

Material y métodos

Se utilizaron 36 organismos de ambos sexos de la especie *Ambystoma mexicanum*, de 1.5 años de edad. Los organismos utilizados en este estudio son el resultado de la reproducción de esta especie en nuestro laboratorio. Los animales se mantuvieron en peceras con solución Holtfreter al 20%, con un sistema de aireación de agua a

CUADRO 1

Criterios para definir las etapas de metamorfosis en *Ambystoma mexicanum*

Etapas	LAD %	AACD %	AAV/AADx100	AAV/AADx100	AV	AAD/AC	LBRS %
C1	100	100	40 o más		—	—	100
I	84 ± 4	86 ± 6	—	25 a 10	—	—	85 ± 4
II	61 ± 1	71 ± 4	—	—	0	—	50 ± 6
III	51 ± 1	69 ± 1	—	—	—	25 a 10	25 ± 2
IV	20 ± 4	63 ± 3	—	—	—	—	3 ± 2

Se anotaron en tono oscuro los principales criterios para la determinación de cada etapa. Los criterios son comparables con los utilizados por Norman (1985), en el *A. tigrinum*. LAD = longitud aleta dorsal. AACD = ancho aleta caudodorsal, AAV = ancho aleta ventral, AAD = ancho aleta dorsal, AC = ancho cola, LBRS = longitud branquias. Respecto a los valores porcentuales, cada uno corresponde a la media ± el error estándar de n = 6. Nuestros grupos control son equivalentes a la etapa I de Norman. La etapa I de este estudio incluye las etapas II y III de Norman. La II y la IV son equivalentes a las etapas IV y VII respectivamente. Mientras que la etapa III incluye a las etapas V y VI de Norman.

una temperatura de 18 a 20° C. El ciclo luz-obscuridad fue de 12 horas. El periodo de luz se inició a las 7 A.M.

Inducción y determinación de las etapas de la metamorfosis

Se formaron tres grupos; un grupo experimental (n = 24), cuyos integrantes se repartieron en 6 peceras, y dos grupos control (n = 6, c/u). Un grupo control correspondía al control sin metamorfosis, y el otro, al control de manipulación.

En los organismos experimentales se indujo la metamorfosis mediante una sola administración intraperitoneal (ip) de tiroxina (T4), a una dosis de 2.5 microgramos/g de peso corporal, en un volumen de 100 a 200 microlitros de solución Ringer para anfibios. Cada organismo del grupo control de manipulación recibió el volumen equivalente de solución Ringer para anfibios.

Los animales del grupo control sin metamorfosis se

sacrificaron el día 0 (día en que se dio el estímulo hormonal a los animales experimentales).

A partir del día de estimulación se registraron los siguientes parámetros en todos los animales experimentales y en los controles de manipulación: ancho de la aleta caudo-dorsal (AACD) ancho de la aleta dorsal (AAD) y ancho de la aleta ventral (AAV), -todas estas medidas se realizaron a 1 cm después de la cloaca-longitud de las branquias (LBRS), -se midió la branquia intermedia de cada lado- longitud de la aleta dorsal (LAD) (figura 1) y peso corporal (PC).

Se definieron 4 etapas de la metamorfosis con base en los criterios de Norman (1985), con algunas modificaciones. En el cuadro 1 se anotan las equivalencias.

Los organismos correspondientes a cada etapa (n = 6) de la metamorfosis, se obtuvieron del grupo experimental con base en los porcentajes de reducción de los parámetros morfométricos. Los criterios principales para definir las etapas de la metamorfosis fueron: el porcentaje de reducción en la LBRS y en el AACD, las pro-

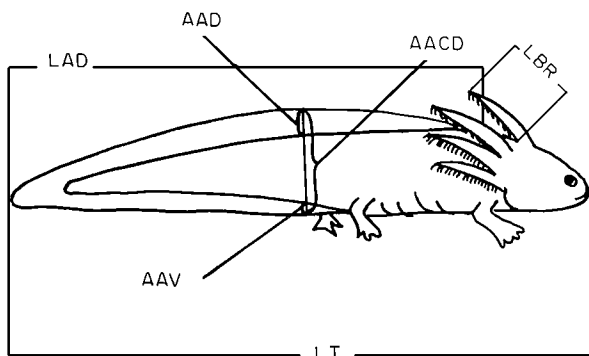


Figura 1. Esquema representativo del cuerpo de *A. mexicanum*. Se señalan los puntos de referencia a partir de los cuales se efectuaron las mediciones de los parámetros morfométricos. AACD = ancho de la aleta caudo-dorsal, AAD = ancho de la aleta dorsal, AAV = ancho de la aleta ventral, LAD = longitud de la aleta dorsal, LBRS = longitud de las branquias, LT = longitud total. Las mediciones de los tres primeros parámetros se efectuaron a 1 cm después de la cloaca.

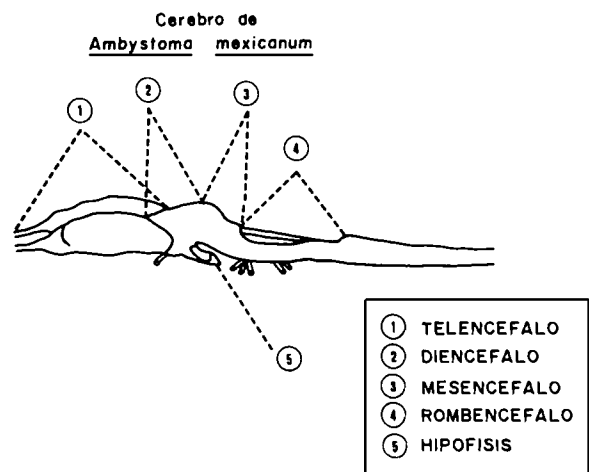


Figura 2. Esquema del cerebro del *A. mexicanum*. Se señala en dónde se hacen los cortes para separar las estructuras.

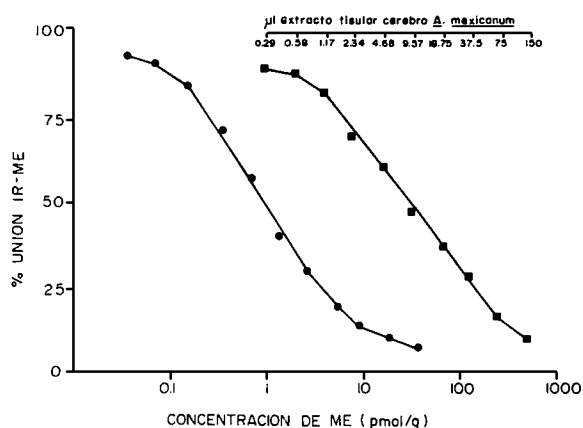


Figura 3. Desplazamiento de la unión de IR-ME al antisero anti-ME por concentraciones crecientes del antígeno frío. El antisero se utilizó a una dilución inicial de 1:2500 (25% de unión máxima). La sensibilidad del ensayo es de 0.2 pmol/tubo. Los valores de concentración de los testigos alto, medio y bajo fueron: 4.6 ± 0.4 , 1.2 ± 0.3 y 0.37 ± 0.1 pmol/tubo respectivamente. La curva en círculos corresponde al desplazamiento con el estándar, mientras que la curva en rombos refleja el desplazamiento del antígeno presente en los extractos cerebrales de *A. mexicanum*. Nótese el paralelismo de ambas curvas. En el extremo superior derecho se anota el volumen correspondiente de los extractos cerebrales.

taje de reducción en la LBRS y en el AACD, las proporciones entre el AAV con respecto a el AAD y el AAD con respecto al AACD.

Se sacrificaron los organismos del grupo control de manipulación cuando los organismos experimentales de la última etapa terminaron la metamorfosis (25 días después del estímulo).

Obtención de los tejidos y su procesamiento para la cuantificación de las encefalinas

Los animales se sacrificaron por decapitación. Se les sacó el cerebro y la hipófisis sobre una superficie fría. Se disecó el diencefalo y la glándula hipófisis según se señala en la figura 2.

Cada estructura se pesó y se incubó en 5 vol de HCl 0.1 N, 15 min a 95°C . Cada muestra se homogeneizó a 3000 rpm y se centrifugó a 20000 rpm a 4°C 1 h. Las ENKs se purificaron a partir del sobrenadante mediante cromatografía de adsorción en amberlita XAD-2, de acuerdo con el método previamente descrito.³⁸

Se llevó a cabo la cuantificación de ENKs mediante el método de radioinmunoanálisis.¹² Los antiseros anti-ENKs se obtuvieron de los conejos de la cepa Nueva Zelanda con base en el método descrito por Vindrola y col. (1981). La iodación de ENKs se efectuó con base en el método de Gros (1978). En las figuras 3 y 4 se presentan las curvas de desplazamiento; se señalan las especificaciones del ensayo y se comparan con las diluciones tisulares del cerebro del *A. mexicanum*.

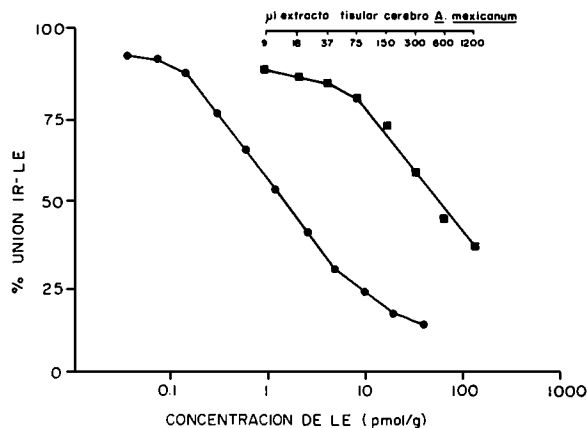


Figura 4. Desplazamiento de la unión de IR-LE al antisero anti-LE por concentraciones crecientes del antígeno frío. El antisero se utilizó a una dilución inicial de 1:2000 (25% de unión máxima). La sensibilidad es de 0.07 pmol/tubo. Los valores de concentración de los testigos alto, medio y bajo fueron: 3.5 ± 0.3 , 1.2 ± 0.1 y 0.2 ± 0.01 pmol/tubo respectivamente. La curva en círculos corresponde al desplazamiento del estándar, mientras que la curva en rombos refleja el desplazamiento del antígeno presente en el extracto cerebral de *A. mexicanum*. Nótese el paralelismo entre ambas curvas. En el extremo superior derecho se anotan los volúmenes correspondientes del extracto tisular.

Resultados

Inducción de la metamorfosis y parámetros morfométricos

Se comprobó que la administración de T4 en *A. mexicanum* produce los cambios característicos de la metamorfosis en los anfibios urodelos. Fue clara la reabsorción de los pliegues dérmicos (aletas, ventral y dorsal), la reabsorción de las branquias y la oclusión de las hendiduras branquiales; también la reducción del peso corporal aunado a la adquisición de una forma corporal más "ovalada", incluyendo la cabeza. La posición de los ojos se modificó de tal forma que estos sobresalieron a la superficie dorsal de la cabeza y se formaron párpados. A lo largo del proceso se observaron las mudas de piel, y la manera como ésta se fue cornificando, y se reorganizó la pigmentación en el organismo.

La determinación cuantitativa de la metamorfosis se efectuó a través de la medición de los parámetros morfométricos. En la figura 5 se señalan los resultados que indican el proceso de reducción de los diferentes parámetros a lo largo de la metamorfosis, y se comparan con los resultados correspondientes al grupo control. La inyección de solución Ringer para anfibios y la manipulación (para efectuar las mediciones) a lo largo del experimento no tienen efectos metamórficos, como lo demuestran los resultados del grupo control de manipulación.

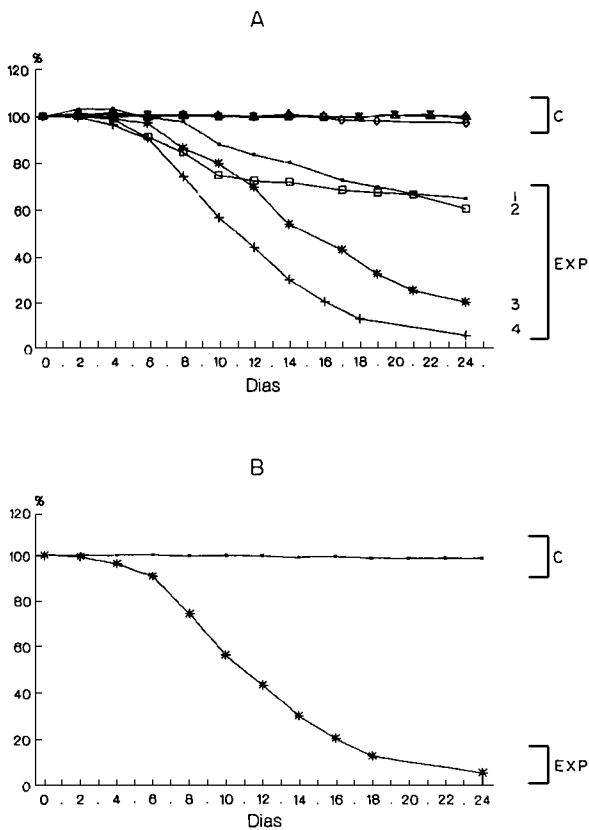


Figura 5. Porcentajes de reducción de los parámetros morfométricos durante la metamorfosis T4 -inducida en el *A. mexicanum*. Cada punto corresponde a la media de n = 6. En A se incluye la mayoría de los parámetros morfométricos los cuales se comparan con los valores control. En B se separan los valores correspondientes al decremento en la longitud de las branquias, ya que se trata de estructuras que pueden seguirse a lo largo de todo el proceso. C = control; Ex = experimental; 1 = peso corporal; 2 = ancho de la aleta caudodorsal; 3 = longitud de la aleta dorsal; 4 = longitud de las branquias.

Los criterios principales para determinar las etapas de la metamorfosis se resumen en el cuadro 1.

Concentración de encefalinas

A lo largo de las etapas metamórficas en *A. mexicanum* se observaron diferencias significativas en la concentración de ENKs en la unidad H-H.

Met-encefalina

Al iniciarse la metamorfosis (etapa I) disminuyó la concentración de IR-ME en el diencéfalo. Este descenso

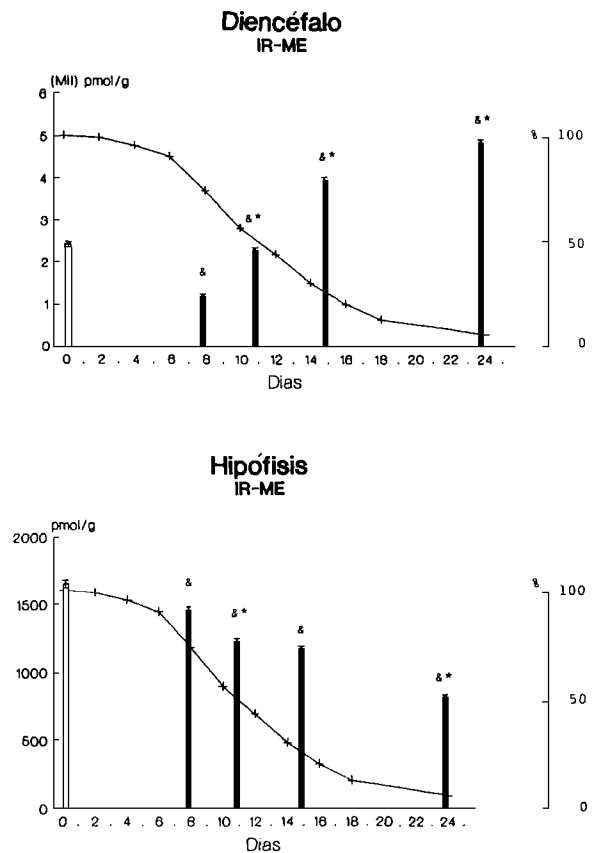


Figura 6. Concentración de IR-ME (pmol/g) en la unidad hipotálamo-hipófisis (barras) en relación con la reducción en la longitud de las branquias (líneas) como un criterio de metamorfosis (los valores porcentuales, en la escala de la derecha) a lo largo de las etapas de la metamorfosis T4-inducida en el *A. mexicanum*. Las condiciones de manipulación experimental se anotan en la sección de material y métodos. Cada valor corresponde a la media± el error estándar de n = 6 para cada etapa y estructura. Los valores de significancia se calcularon mediante la prueba "t" de Student. & (P respecto al control), * (P respecto a la etapa inmediata anterior). & y * = P < 0.000. Las barras blancas corresponden a los valores control (premetamorfosis). Las barras oscuras (representan, de izquierda a derecha) las etapas metamórficas I, II, III y IV, respectivamente.

transitorio fue seguido por un incremento gradual que durante la etapa IV (al final de la metamorfosis) prácticamente duplicó sus valores. Las diferencias resultaron significativas tanto respecto al control como a la etapa inmediata anterior. La concentración de IR-ME en la hipófisis presentó una disminución gradual a lo largo de la metamorfosis, con diferencias significativas respecto al control, en cada etapa. En las etapas II y IV también se observaron diferencias significativas respecto a la etapa inmediata anterior (figura 6).

Leu-enkefalina

Durante la etapa I aumentó la concentración de IR-LE en el diencéfalo y en las etapas subsecuentes disminuyó gradual y progresivamente, hasta alcanzar, en la etapa IV, valores inferiores al 50 % con respecto al control. La concentración de IR-LE presentó un incremento gradual en la hipófisis hasta la etapa II, a partir de la cual se presentó un decremento con diferencias significativas respecto al control y a la etapa inmediata anterior, en las etapas III y IV (figura 7).

Discusión*Inducción de la metamorfosis*

Nuestros resultados comprueban el efecto de la T4 en el rompimiento de la neotenia y, por lo tanto, sobre la inducción de la metamorfosis con hormonas tiroideas en *A. mexicanum*. Estos resultados confirman numerosos estudios sobre la dependencia del proceso de la metamorfosis respecto a la función tiroidea.^{10,17} Los niveles basales de T4 son indetectables en el *A. mexicanum*.¹⁷ Se considera que por no haber suficiente T4 circulante, no es posible la estimulación inicial (retroalimentación positiva) que desencadenaría la cascada de cambios en los tres sustratos anatómicos que regulan la metamorfosis.^{2,10,17} Nuestros resultados coinciden con el planteamiento de que el que no se produzca la metamorfosis en el *A. mexicanum* se debe a la escasez de T4 y no a la falta de responsabilidad de la unidad H-H y de los tejidos periféricos a la hormona.²⁹

Cambios en la concentración de ENKs

Nuestros resultados concuerdan con los presentados por otros investigadores, respecto a que los sistemas de mensajeros químicos en el sistema nervioso se modifican por medio de la metamorfosis.^{6,7} Los sistemas de vías neurales correspondientes al factor liberador de la corticotropina (FLC) y a la arginina vasotocina se desarrollan con la metamorfosis.⁶ Por otro lado, los niveles circulantes de FLC cambian en forma bifásica durante la metamorfosis, con los valores más altos a la mitad del proceso.⁷ Estos hallazgos y los que aquí presentamos, resaltan la importancia de las modificaciones en estos sistemas, como parte del reacomodo morfo-funcional de los mecanismos de ajuste a una nueva forma de vida.

La metamorfosis en los anfibios constituye un proceso adaptativo de reorganización y desarrollo morfo-funcional complejo, que abarca por lo menos tres categorías: reabsorción, reorganización (maduración) y formación.¹⁰

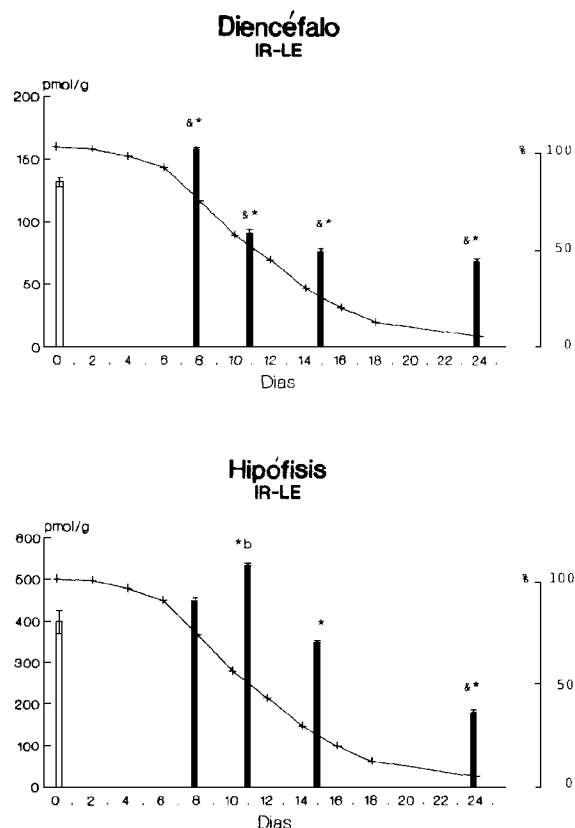


Figura 7. Concentración de IR-LE (pmol/g) en la unidad hipotálamo-hipófisis (barras) en relación con la reducción en la longitud de las branquias (líneas), como un criterio de metamorfosis (los valores porcentuales, en la escala de la derecha) a lo largo de las etapas de la metamorfosis T4-inducida en el *A. mexicanum*. Las condiciones de manipulación experimental se anotan en la sección de material y métodos. Cada valor corresponde a la media \pm el error estándar de $n=6$ para cada etapa y estructura. Los valores de significancia se calcularon mediante la prueba "t" de Student. & y b (P respecto al control), * (P respecto a la etapa inmediata anterior). & y * = $P < 0.000$, b = $P < 0.001$. Las barras blancas corresponden a los valores control. Las barras oscuras representan, de izquierda a derecha, a las etapas metamórficas I, II, III y IV, respectivamente.

En este contexto la unidad H-H corresponde a la segunda categoría. Se trata de estructuras ya presentes, en las que ocurre simultáneamente una reestructuración morfo-funcional^{2,10,17}

La reorganización de la unidad H-H resulta primordial para la regulación y mantenimiento de las variables fisiológicas cuyos puntos de ajuste difieren cuali- y cuantitativamente de los que el organismo requería en el habitat anterior. De hecho, los cambios asociados a esta unidad regulan todas las funciones neuroendocrinas que requieren de un reajuste con la metamorfosis.^{10,23}

En el presente estudio observamos que en la unidad H-H se presentan cambios significativos en la concen-

tración de ambas ENKs durante un proceso cuya activación y desarrollo depende de la regulación neuroendócrina. Los cambios podrían relacionarse con el proceso de reorganización anatómo-funcional que involucra la metamorfosis en la unidad H-H, por ejemplo, en relación con el equilibrio hidrosmótico y el control de la temperatura corporal, que son de vital importancia, sobre todo si consideramos que después de la metamorfosis, los organismos tienen que adaptarse a un nuevo habitat. En estos vertebrados se logra evitar la pérdida de humedad por medio del ajuste entre la temperatura corporal y el termostato hipotalámico en relación con las temperaturas medioambientales a lo largo de las modificaciones en el comportamiento, ya que se trata de organismos poiquilótermos. El hipotálamo activa los mecanismos encargados de minimizar la pérdida de calor.²³

Se considera que durante la metamorfosis de los anfibios, la reabsorción de las aletas caudales puede funcionar como un mecanismo osmoregulador en la naturaleza, y que tanto la PRL como la OXT participan en este proceso. Al parecer, la OXT actúa contrarrestando la acción antidiurética de la PRL a nivel tisular.³² Del mismo modo, se ha sugerido la participación de las ENKs en la osmorregulación de los mamíferos.³⁶ Además, es probable que en los anfibios se establezca un sistema de interacción múltiple entre diferentes mensajeros químicos, incluyendo las ENKs, en la regulación de las funciones neuroendocrinas. La administración de ENKs en los mamíferos, incrementa los niveles plasmáticos de PRL y GH; mientras que disminuye los niveles de LH.^{3,20,34} Por lo tanto, los cambios de concentración de las ENKs, a lo largo de la metamorfosis, podría relacionarse con la regulación de la secreción de otros mensajeros químicos.

Por el momento se desconoce con precisión el papel funcional de las ENKs, así como su mecanismo de acción; sin embargo, nuestros resultados enriquecen las evidencias que sugieren la participación de las ENKs en la regulación de las funciones neuroendocrinas de los vertebrados, en particular durante la metamorfosis de *A. mexicanum*.

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Valverde por su asesoría constante durante el desarrollo del presente trabajo y por sus comentarios sobre la discusión. A la Sra. Carmen Navarro, a los Sres. Pablo, Agustín y Gabriel Linares por su asistencia técnica. Trabajo apoyado parcialmente por el CONACYT D111903854.

Referencias

1. 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.
2. BENTLEY P: *Comparative Vertebrate Endocrinology*. Cambridge University Press. Londres, 415 págs, 1976.
3. BRUNI J, VUGHT D, MARSHALL S, MEITES J: Effects of naloxone, morphine and methionine enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle growth hormone. *Life Sci*, 21:461-466, 1977.
4. BUCHAN A: Immunocytochemical study of regulatory peptides in the amphibian gastrointestinal tract. *Can J Zool*, 64:1-7, 1986
5. CANO A, VARGAS A, MATAMOROS G, ANTON F, ASAI M: Regional brain and pituitary enkephalins changes with age and metamorphosis in *Ambystoma tigrinum*. *Mem Soc Neurosci*, 16:867, 1990.
6. CARR J, NORRIS D: Immunohistochemical localization of corticotropin-releasing factor and arginine vasotocin-like immunoreactivities in the brain and pituitary of the american bullfrog, (*Rana catesbeiana*) during development and metamorphosis. *Gen Comp Endocrinol*, 78:180-188, 1990.
7. CARR J, NORRIS D: Interrenal activity during metamorphosis of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum*. *Gen Comp Endocrinol*, 6:491-500, 1988.
8. DARRAS M, KUHN E: Differences of the *in vitro* responsiveness to thyrotropin stimulation between the neonetic and metamorphosed axolotl, *Ambystoma mexicanum*: failures of prolactin to block the thyrotropin-induced thyroxine release. *Gen Comp Endocrinol*, 56:321-325, 1984.
9. DARRAS M, KUHN E: Effects of TRH, bovine TSH, and pituitary extracts on thyroidal T4 release in *Ambystoma mexicanum*. *Gen Comp Endocrinol*, 51:286-291, 1983.
10. DUELLMAN W, TRUEB L: *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Book Company, NY, pp:173.194, 1984.
11. GUTIERREZ R: Neurobiología de los opioides. *Ciencia*, 43:47-61, 1992.
12. GROS C, PRADELLES P, POUGET C, BEPOLDIN O, DRAY F: Radioimmunoassay of methionine and leucine-enkephalins in regions of rat brain and comparison with endorphins stimulated by a radioreceptor assay. *J Neurochem*, 31:29-39, 1978.
13. HUGHES J: (Ed) Opiate peptides. *BR Med Bull*, 39:1:106, 1983.
14. HUGHES J, SMITH T, KOSTERLITZ H, FOTHERGILL L, MORGAN B, MORRIS H: Identification of two pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258:577-579, 1975.
15. JACOB J: Endogenous morphines and pain control. *Pain-minerva Medica-Europa*, *Medica*, 24(2):155-159, 1982.
16. KILPATRICK D, HOWELLS R, LAHAM H-M, UDENFIEND S: Evidence for a proenkephalin-like precursor in amphibian brain. *Proc Natl Acad Sci*, 80:5772-5775, 1983.
17. KUHN E, JACOBS F: Metamorphosis: En: *Developmental Biology of Axolotl*. (Eds.) Armstrong J, and Malacinski G, Oxford University Press, NY, 1989.
18. LÉBOULENGER F, CUPO A, CASTANAS E, BENYAMINA M, PELLETIER G, VAUDRY H: Immunohistochemical and biochemical evidences for the presence of the pentapeptide met-enkephalin and the heptapeptide Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu in amphibian cromaffin cells. *Neurochem Int*, 8:303-309, 1986.
19. LEÓN M, SÁNCHEZ M, PIÑA A-L, 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.
20. LIEN E, FINECHEL R, GERSKY V, SARATAKIS D, GRANT N: Enkephalin-stimulated prolactin release. *Life Sci*, 19:837-840, 1976.
21. LORENZ H, KEMALI M: Substance P-(Met)enkephalin-immunoreactivity and somatostatin-like immunoreactivity distribution in the frog spinal cord. *Neurosci Lett*, 26:119-124, 1981.
22. LORD J, WATERFIELD A, HIGHERS J, KOSTERLITZ J: Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature Lond*, 267:495-499, 1977.

23. MALCOM S: *Fisiología Animal. Principios y adaptaciones al medio ambiente*. Tercera impresión. (CECSA). México. 747 págs, 1984.
24. MARTIN W, EADES C, THOMSON J, HUPPER R, GILBERT P: The effects of morphine and nalorphine-like drugs in independent and morphin dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther*, 197:517-532, 1976.
25. MILLER R: Peptides and neurotransmitters: focus on the enkephalins and endorphins. *Pharmacol Ther*, 12:73-108, 1981
26. Miller R, Pickel V: The distribution and functions of the enkephalins. *J Histochem Cytochem*, 28:908-917, 1980.
27. MORLEY J: The endocrinology of opiates and opioid peptides. *Metabolism*, 30:195-209, 1981
28. NORMAN F: A practical method for staging metamorphosis in the tiger salamander *Ambystoma tigrinum*. *Anat Record*, 211:102-109, 1985.
29. NORRIS O, GERN A: Tiroxine-induced activation of hipotalamo-hypophysial axis in neotenic salamander larvae. *Science*, 194:525-526, 1976.
- 30 PERT C, APOSHIAN D, SNYDER S: Phylogenetic distribution of opiate receptors binding. *Brain Res*, 75:356-361, 1974.
31. PERT C, SNYDER S: Opiate receptors: Demonstration in nervous tissue. *Science*, 179:1011-1014, 1973
32. PLATT J, LICAUSE M: Effect of oxytocin in larval *Ambystoma tigrinum* :Aceleration of induced metamorphosis and inhibition of the antimetamorphic action of prolactin. *Gen Comp Endocrin*, 41:81-95, 1980.
- 33 SCHICK S, SCHUSDZIARRA V: Physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of exogenous and endogenous opiates. *Clin Physiol Biochem*, 3:43-60, 1985.
34. SHAAR J, FREDERICKSON A, DININGER B, JACKSON L: Enkephalin analogues and naloxone modulate the release of growth hormone and prolactin-evidence for regulation by an endogenous opioid peptides in brain. *Life Sci*, 21:853-860, 1977.
35. SIMANTOV R, GOODMAN R, APOSHIAN D, SNYDER S: Phylogenetic distribution of a morphine-like peptides enkephalin. *Brain Res*, 111:204-211, 1976.
36. SUMY-LONG J, MILLER S, ROSELL-DEMPMAN M, HARTMAN D, EMMET E: A fuctional role for opioid peptides in the differential secretion of vasopressin and oxytocin. *Brain Res*, 309:362-366, 1984.
37. UDEFRIEND S, KILPATRICK D: Biochemistry of the enkephalins and enkephalin-containing peptides. *Arch Biochem Biophys*, 221:309-323, 1983.
38. VINDROLA O, BRIONES R, ASAI M, FERNÁNDEZ-GUARDIOLA A: Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in rat brain. *Neurosci Lett*, 21:39-43, 1981.
39. WATT C, LI W, FRAY R, LAM D: Localization of enkephalin-like immunoreactive amacrine cells in the larval tiger salamander retina: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, 24 :1179-1189, 1984.