Péptidos opioides en los anfibios

Agustina Cano Martínez*

Summary

In this work we present information about the identification of opioid peptides and receptors in the nervous system and other tissues of amphibians. Evidences about the possible participation of opioid systems in the amphibians physiology are included. The importance of the studies of opioids in amphibians is considered in relation to significance of these animals in the evolution of vertebrates, and their utility as a study model for opioids due to their simplicity and plasticity, particularly in the development and nociception process.

Resumen

En el presente trabajo se incluye la información referente a la identificación de péptidos y receptores opioides en el sistema nervioso y en otros tejidos de los anfibios; del mismo modo, se incluyen las evidencias que indican la posible participación de los sistemas opioides en la fisiología de los anfibios. También se considera la importancia del estudio de los opioides en los anfibios, por el significado que tienen estos animales como grupos de transición en la evolución de los vertebrados; mismos que por su sencillez y plasticidad representan un excelente modelo para el estudio de los opioides, en particular, por su relación con los procesos de desarrollo y nocicepción.

Introducción

A casi 20 años del descubrimiento de los primeros péptidos opioides (las encefalinas) (32), se reconocen más de 20 secuencias aminoácidas con características opioides, mismas que provienen de alguna de las tres proteínas precursoras caracterizadas en mamíferos: la proopiomelanocortina (POMC), la proencefalina (PEF) y la prodinorfina (PDNF), que a través del procesamiento postraduccional, dan lugar a los péptidos opioides bioactivos que tienen en común, la secuencia de alguna de las dos encefalinas: Met-encefalina (ME) o Leu-encefalina (LE) (71).

A partir de su descubrimiento en el sistema nervioso de mamíferos, la existencia de los péptidos opioides se ha demostrado en todos los tejidos y especies animales examinadas (9,29), e incluso se tienen evidencias de la presencia de ACTH y beta-endorfina en un eucarionte unicelular (*Tetrahymena pyriformis*) (44).

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

La existencia de los tres sistemas principales de péptidos opioides (18,49,50,64) y de los receptores opioides (66), también se ha demostrado en anfibios.

Con la identificación de la dermofina (52) y de la deltorfina (36), a partir de extractos de piel de la rana Sur Americana *Phylomedussa sauvagei*, se ha sugerido la existencia de un cuarto sistema de péptidos opioides en los anfibios. Se considera que este cuarto sistema también podría existir en el cerebro tanto de mamíferos (7) como de anfibios (28); es decir, que se podría considerar a los péptidos, originalmente extraídos de la piel de *Phylomedussa sauvagei*, como una nueva familia de neuropéptidos (28).

Por la importancia de los anfibios como un grupo de transición en la evolución de los vertebrados y las potencialidades que estos organismos reflejan en cuanto a su utilización como modelos de estudio de los sistemas opioides, el presente trabajo incluye la información existente a cerca de los receptores y péptidos opioides en diferentes especies y tejidos de anfibios; del mismo modo, se considera el posible significado fisiológico y filogenético de los opioides en este grupo de vertebrados.

I. Receptores opioides en los anfibios

Estudios in vitro*; unión a receptor*

Las primeras evidencias sobre la existencia de receptores opioides en el cerebro de anfibios, se obtuvieron en estudios comparativos mediante ensayos *in vitro*, con la demostración de la unión de agonistas y antagonistas en preparaciones membranales obtenidas del cerebro de diferentes vertebrados, incluyendo a los anfibios. En el cerebro del sapo *Bufo marinus*, se cuantificó la unión estereoespecífica de H3-dihidromorfina en rebanadas cerebrales (57) y sinaptosomas (67). En otro estudio comparativo, por medio de la unión de 3H-etorfina y 3H-D-Ala2-Leu-encefalinamida, se demostró la existencia de receptores opioides tipo mu y tipo delta en cerebro de anfibios urodelos (3). En el cerebro de *Xenopus laevis*, la naloxona inhibe de una manera menos eficaz la unión del agonista, que en preparaciones provenientes de cerebro de rata (6,23). Estos resultados han hecho sugerir la existencia de diferencias en cuanto a la expresión de los tipos de receptores opioides entre anfibios y mamíferos; lo que concuerda con los resultados de Audigier y cols. (3), respecto a las diferencias en las proporciones de receptores delta/mu en urodelos y preurodelos, con valores más bajos que en la rata.

Demostración bioquímica de receptores opioides

Ante las evidencias iniciales, no se hicieron esperar los estudios enfocados a la solubilización y separación de las proteínas receptoras de opioides a partir de tejido cerebral de anfibios.

A partir del cerebro de *Bufo marinus*, se demostró la existencia de sitios de unión para opiáceos en las preparaciones membranales, así como la solubilización de éstos desde las membranas. En ambos casos se encontró una unión débil para las encefalinas (agonistas delta), y alta para agonistas mu, sugiriendo que los receptores en estas preparaciones podrían ser predominantemente del tipo mu (62). Sin embargo, con otro método de solubilización, Simón y cols. (65), encontró que el cerebro de *Bufo marinus* contiene principalmente receptores tipo kappa y sigma. Resultados que se corroboraron mediante la solubilización con digitonina en fracciones membranales de cerebro de *Rana esculenta* (66), se comprobó el carácter de estereoespecificidad y heterogeneidad de los receptores opioides con base en el análisis de las constantes de disociación, tanto en las membranas como en los extractos con digitonina, identificando sitios de alta y baja afinidad. Las proporciones de receptores encontradas en Rana esculenta en comparación con la rata, se anotan a continuación:

Receptor	*Rata*	*Rana esculenta*
mu	50 %	12-16 %
delta	10 %	12-16 %
kappa	40 %	70 %

La predominancia de uno de los tipos de receptores podría relacionarse con la predominancia de alguno de los ligandos opioides endógenos.

Con base en los estudios *in vitro* realizados en cerebro de mamiferos, se sabe que los receptores kappa son altamente selectivos para las dinorfinas, aunque la dinorfina 1-8 conserva afinidad por el receptor delta y la dinorfina 1-13 es potente tanto para mu como para kappa (29). Se podría esperar que en el cerebro de *Rana esculenta*, los opioides endógenos predominantes fueran las dinorfinas.

Es importante destacar que la diferencia en cuanto a las proporciones del tipo de receptor, podría variar dependiendo de la especie y el método de solubilización; por lo que cualquier interpretación debe considerar ambos aspectos.

Por otro lado, se hipotetiza la existencia de proteínas receptoras para opioides en la piel de anfibios, dada la presencia de péptidos opioides en este tejido (dermofina, deltorfina) y la demostración de las afinidades con selectividad tipo mu por la dermofina y tipo delta para la deltorfina (36).

II. Identificación de los precursores y ligandos opioides endógenos en anfibios

En las tablas 1 y 2 se resume la información correspondiente y a continuación se analizan las evidencias existentes de manera detallada de los precursores y sus péptidos derivados.

Proopiomelanocortina (POMC)

Se ha demostrado que el procesamiento de la POMC en la hipófisis de ranas produce beta-endorfina (58) por medio de incubaciones de pulso-caza *in vitro*. Con cromatografía líquida de alta presión (HPLC) e incorporación de aminoácidos e inmuniprecipitación; con el lóbulo neurointermedio de la hipófisis de *Xenopus laevis* se identificaron dos péptidos opioides (beta-endorfina-like), así como péptidos parecidos a la melanotropina y ACTH, mismos que se sabe son derivados de la POMC (51). En *Rana temporaria* se hizo un estudio de distribución mediante IHQ; se identificó alfa y beta-endorfina en hipotálamo e hipófisis (21). La cuantificación por radioinmunoanálisis (RIA) en extractos de hipófisis y cerebro de ranas, ha demostrado que la beta-endorfina se encuentra en mayores concentraciones que en rata (34). La identificación de precursores intermediarios de la POMC, así como de la beta-endorfina, se identificó en la hipófisis de *Rana ridibunda* por medio de la misma metodología utilizada por Martens y cols. en *Xenopus laevis* (51,73).

La posibilidad de un precursor semejante a la POMC en anfibios, también fue planteada por todos los estudios antes mencionados; y hacia 1985, Martens y su grupo consiguió la secuencia nucleótida de la POMC en *Xenopus laevis* (49). Se observó un alto grado de homología con la POMC de mamífero; sin embargo, el procesamiento podría ser distinto (73) (fig. 1). La presencia de la beta-endorfina se ha confirmado en la hipófisis anterior de *Xenopus laevis* (22) y *Ambystoma mexicanum* (42).

TABLA 1a
Proopiomelanocortina (POMC) en anfibios

Especie	*Tejido*	Péptido	*Técnica*	*Referencia*
Rana temporaria&	Hipotálamo hipófisis	alfa y beta endorfina	IHQ	Doerr-Schott y cols., 1981
Rana ridibunda&	Hipófisis (LNI) precursores intermedios	B-endorfina HPLC IMP	PC Ia.a HPLC IMP	Vaudry y cols., 1984
Xenopus laevis&	ADN de CS	ADN POMC	ADNc-POMC BM	Martens y cols., 1985
Xenopus laevis&	Hipófisis posterior	B-endorfina	IHQ	Dores y Rothenberg, 1987
Ambystoma mexicanum	Hipófisis	B-endorfina	IHQ	León-Olea y cols, 1991

IHQ = Inmunohistoquímica, PC = Pulso, Caso Ia. a = Incorporación de Aminoácidos marcados, HPLC = Cromatografía Líquido de Alta Presión
IMP = Inmunoprecipitación, ADN = Acido Desoxirribonucléico, ADNc = ADN complementario de la POMC proveniente de mamíferos
CS = Células Sanguíneas, BM = Biología Molecular, & = anfibios anuros, * = anfibio urodelo.

TABLA 1b
Proencefalina (PEF) en anfibios

Especie	*Tejido*	*Péptido*	*Técnica*	*Referencia*
Rana 1 temporaria	Cerebro	ME	IHQ	Doerr-Schott y cols., 1981
Bufo 1 marinum	Cerebro	ME, LE, HE	RIA, HPLC	Kilpatrick y cols., 1983
Rana 1 ribidunda	Gránulos cromafines cromafines	ME, LE, Synenk Synenk	IHQ	Leboulenger y cols., 1983 1984, 1986
Xenopus 1 laevis	ADN de CS	ADN-PEF	ADNc-PEF	Martens y Herbert 1984
Ambystoma2 triginum	Retina	ME	IHQ	Watt y cols, 1985
Ambystoma2 triginum	Tracto gastrointestinal	ME,	IHQ	Buchan, 1986.
Ambystoma2 mexicanum	Cerebro hipófisis	ME, LE, precursores putativos	RIA, CFM	Cano, 1987
Ambystoma2 mexicanum	Cerebro hipófisis	ME, LE	RIA	Asai y cols., 1988
Ambystoma2 tigrinum	Cerebro hipófisis Antes y después metamorfosis	ME, LE	RIA	Cano y cols., 1990
Ambystoma2 mexicanum	Hipófisis	ME, LE	IHQ	León-Olea y cols 1991
Ambystoma2 mexicanum	Cerebro hipófisis en 4 etapas metamorfosis T-4 inducida	ME, LE	RIA	Cano y cols., 1993

ME = Met-encefalina, IHQ = Inmunohistoquímica, LE = Leu-encefalina, HE = Heptapéptido = ME-Arg-Phe, RIA = Radioinmunoanálisis, HPLC = Cromatografía Líquido de Alta Presión, Syenk = Región amino terminal de la PEF que no contiene encefalinas, ADN = Acido Desoxirribonucleíco, ADNc = ADN complementario de la PEF humana, RIA = Radioinmunoanálisis, CFM = cromatografía de filtración molecular,
1 = anfibios anuros, 2 = anfibios urodelos.

TABLA 1c
Prodinorfina (PDNF) en anfibios

Especie	*Tejido*	*Péptido*	*Técnica*	*Referencia*
Bufo 1 marinus	Cerebro Hipófisis Médula espinal	din-1-13	RIA CFM HPLC	Cone y Goldstein, 1982
Bufo 1 marinus	Cerebro	din 1-17 din 1-8 din B a-neoendorfina, LE	RIA CFM HPLC	Sei y cols., 1989
Ambystoma mexicanum2	Telencéfalo	din 1-8	RIA	Cano y cols., 1993

din-1-13 = Dinorfina, RIA = Radioinmunoanálisis, CFM = Cromatografía de filtración molecular, HPLC = Cromatografía líquida de alta presión, LE = Leu-encefalina, 1 = anfibio anuro, 2 = anfibio urodelo

Proencefalina (PEF)

Anfibios anuros (sapos y ranas)

Después de la identificación de las encefalinas en mamíferos (32), se demostró la existencia de factores opioides endógenos en extractos cerebrales de diferentes vertebrados, desde ciclostomos hasta primates (67). Estos autores probaron la habilidad de los extractos cerebrales de las diferentes especies para desplazar la unión de la naloxona tritiada en homogenados de rata. También encontraron que todos los vertebrados examinados contenían cantidades sustanciales de opioides endógenos, con las concentraciones más altas en las especies no mamíferas. Aunque se hace notar la presencia creciente de corteza cerebral, la cual contiene muy bajos niveles de opioides, con lo que los valores de concentración en mamíferos se diluyen, resulta muy interesante que las concentraciones más altas fueron encontradas en un anfibio, en *Bufo marinus* (67).

En estudios más recientes utilizando las técnicas de RIA e inmunohistoquímica (HIQ), se ha demostrado que existen altas concentraciones de IR-ME en cerebro, hipófisis, retina, piel y sangre de la *Rana pipiens* (33). En la médula espinal de la *Rana esculenta* se detectó IR-ME, con fibras tenidas en el asta dorsal, el área gris e intermedia, así como en los cuerpos celulares (47). Una examinación anatómica detallada del dien-

TABLA 2
Dermofina (DMF)

Especie	*Tejido*	*Péptido*	*Técnica*	*Referencia*
Phylomedusa sauvagei	Piel	Dermofina sauvagina	BQ, aislamiento secuencia a.a.	Montecuchi y cols., 1981
Phylomedusa sauvagei	Piel	Deltorfina	BQ	Kreil y cols., 1989
Phylomedusa sauvagei				Erspamer-V, 1992

BQ = Bioquímicas, extracción, aislamiento y secuencia aminoácida
Phylomedusa sauvagei es un anfibio urodelo

céfalo reveló: fibras IR-ME en el núcleo infundibular, la eminencia media y la neurohipófisis de *Rana temporaria* (21) (fig. 2) y *Rana catesbiana* (75).

Mediante la cromatografía de filtración en gel a partir de extractos de cerebro completo de *Bufo marinus*, en combinación con RIA y HPLC, se identificó la presencia de IR-ME, IR-LE y heptapéptido (ME-Arg-Phe) (HE), con IR para las encefalinas en material eluido en la zona correspondiente a alto peso molecular (37), lo que hizo sugerir la existencia de una molécula pre-

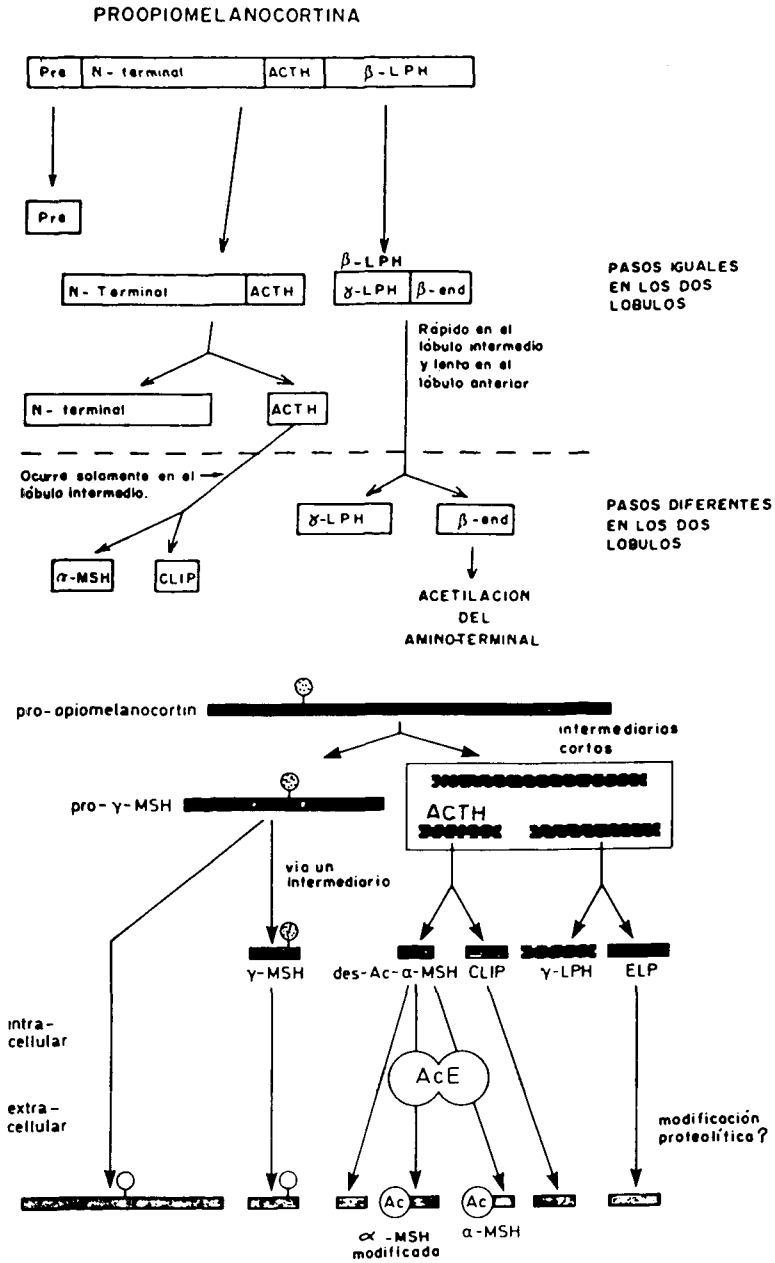

Figura 1. Representación del procesamiento de la POMC en el lóbulo intermedio y anterior de la hipófisis de rata y ratón (Douglas y cols., 1984), en comparación con su procesamiento en el lóbulo intermedio de la Rana ridibunda (Vaudry y cols., 1984). En el esquema para Rana ridibunda se señalan en los recuadros punteados los posibles intermediarios en el procesamiento, se propone que una vez que el complejo enzimático ha iniciado su actividad, el rompimiento del precursor lleva rápidamente a des-N alfa-acetil alfa-MSH, CLIP y ELP (péptidos endorfina-like). El fragmento N terminal de la POMC liberado es un intermediario de alto peso molecular en la producción de gamma MSH. En Rana no se detectó MSH acetilada a nivel intracelular y el sistema de enzimas acetilantes (AcE) al parecer está unido a membrana. ACTH = hormona adrenocorticotrópica; LPH = lipotropina; MSH = hormona estimulante de los melanocitos; CLIP = péptido corticotropina-like; ELP = péptidos endorfina-like.

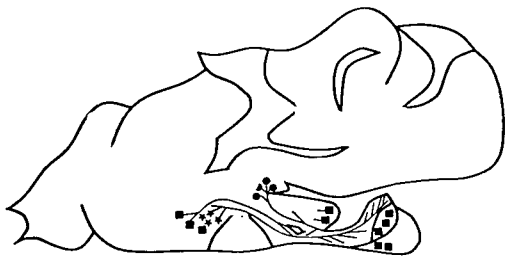

Figura 2. Representación esquemática de un corte sagital del cerebro de Xenopus laevis. Se muestran las proyecciones de lo sistemas: encefalinérgicos (—★); endorfinérgicos (—●) y preóptico-hipofisiario(—■) (Modificado de Doerr-Schott., 1981).

cursora de alto peso molecular para las encefalinas en el cerebro de los anfibios, como se había demostrado para los mamíferos. La presencia del heptapéptido, (mismo que corresponde al extremo carboxilo terminal de la PEF y se encuentra en proporciones equivalentes con la ME en mamíferos), es una evidencia de que una molécula semejante a la PEF, podría existir en anfibios. Es importante destacar que este es el primer trabajo que detecta IR-LE, si bien en muy bajas concentraciones (10 pmol/g) en un anfibio (37).

En las células cromafines de glándula adrenal de *Rana ridibunda*, por medio de IHQ y RIA, se demostró la existencia de IR-ME, así como su coexistencia con el péptido vasoactivo intestinal (VIP) (41). Leboulenger y cols. (39) detectaron IR para la *synenkephalin* (región amino terminal de la PEF, donde no existe ninguna secuencia de encefalinas) en células cromafines de *Rana ridibunda*, y también, proponen que en las células cromafines de los anfibios, podría existir una molécula precursora semejante a la PEF de mamíferos (39).

En los diferentes tejidos de mamíferos, el HE y el octapéptido (ME-Arg-Gly-Leu) (OC), dos péptidos característicos de la PEF se encuentran en cantidades equimolares; sin embargo, en cerebro (37) y células cromafines (40) de anfibios, se ha detectado IR-HE pero no IR-OC, lo que indica que el precursor de estos péptidos en anfibios, difiere en algunos aspectos con el de mamíferos.

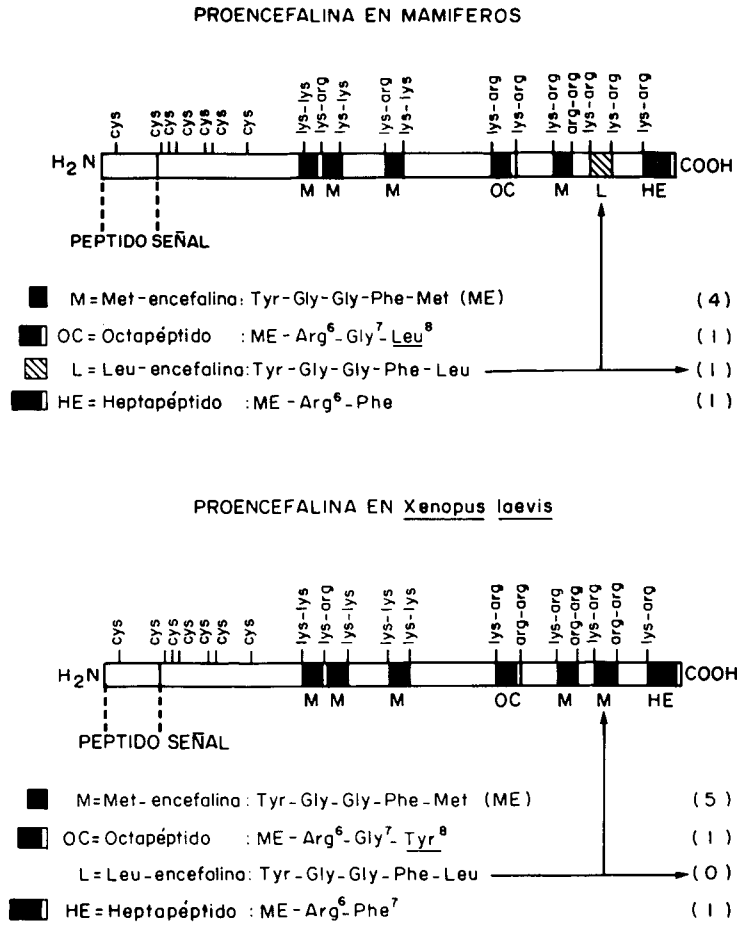

Figura 3. Comparación de la estructura de la PEF en mamíferos y Xenopus laevis. Se señalan las diferencias en el contenido de LE y la secuencia aminoácida del OC.

Tanto las semejanzas como las diferencias sugeridas por los estudios histológicos y bioquímicos, se ven confirmados cuando en el anfibio *Xenopus laevis*, por medio de técnicas de biología molecular, se identificó la secuencia nucleótida del gen que codifica para la PEF, observándose que se trata de una proteína con un alto grado de homología (fig. 4), con la PEF de mamíferos (50); sin embargo, presenta algunas diferencias importantes, respecto a las encefalinas y el OC (fig. 3).

La estructura primaria de los principales exones de los genes de la PEF en *Xenopus laevis*, codifican para 5 secuencias de ME, una del HE y en la posición correspondiente al OC, dentro del precursor, muestra la siguiente secuencia: ME-Arg-Gly-Tyr; que sólo difiere del OC de mamíferos en el último aminoácido que es Tyr y no Leu. Las secuencias de ME, HE y ME-Arg-Gly-Tyr, dentro de la PEF de *Xenopus laevis*, se encuentran en las mismas posiciones; están limitadas por pares de aminoácidos básicos al igual que en mamíferos, y su proporción es: 5ME:1HE:1ME-Arg-Gly-Tyr (figs. 3 y 4).

Anfibios urodelos (salamandras y especies afines)

Por medio de IHQ se determinó la presencia IR-LE en las células amácrinas de larvas de *Ambystoma tigrinum*. La IR para encefalinas se observó principalmente en las células amácrinas de la capa nuclear interna y la capa de células ganglionares. Las células inmunorreactivas para encefalinas se observaron en posición pre y postsináptica a otras células amácrinas no encefalinérgicas de la capa plexiforme interna (74). Los autores plantean la posibilidad de interacciones sinápticas del sistema encefalinérgico con otros sistemas de neurotransmisión, como la dopamina y el GABA, tal como se ha demostrado en mamíferos; también proponen interacciones sinápticas entre células amácrinas encefalinérgicas con células ganglionares.

Por medio de esta misma técnica se identificó IR-ME en las fibras nerviosas del tracto gastrointestinal de *A. mexicanum*, postulando la posible participación de las encefalinas en la regulación de la contracción del músculo intestinal de esta especie (8).

La primera evidencia bioquímica de la presencia de encefalinas en el cerebro y la glándula hipófisis de un anfibio urodelo, se obtuvo en nuestro laboratorio mediante la técnica de RIA. Se cuantificó la concentración de ambas encefalinas en 3 regiones cerebrales (telencéfalo, diencéfalo y rombencefalo) y la glándula hipófisis del axolotl *Ambystoma mexicanum* (2,9). La proporción ME:LE fue de 9:1 en las regiones cerebrales y de 2:1 en la glándula hipófisis.

Mediante cromatografía de filtración molecular, digestión enzimática secuencial, con tripsina y carboxipeptidasa B y RIA, se encontró que el procesamiento del precursor principal da lugar en una proporción mayor a péptidos de bajo peso molecular: ME, LE y péptidos que contienen ME, ya que como resultado del tratamiento enzimático en las fracciones resultantes de la cromatografía en *Sephadex*, se observó un incremento en la IR-ME obtenida para las fracciones correspondientes a bajo peso molecular (600 D) (fig. 5)

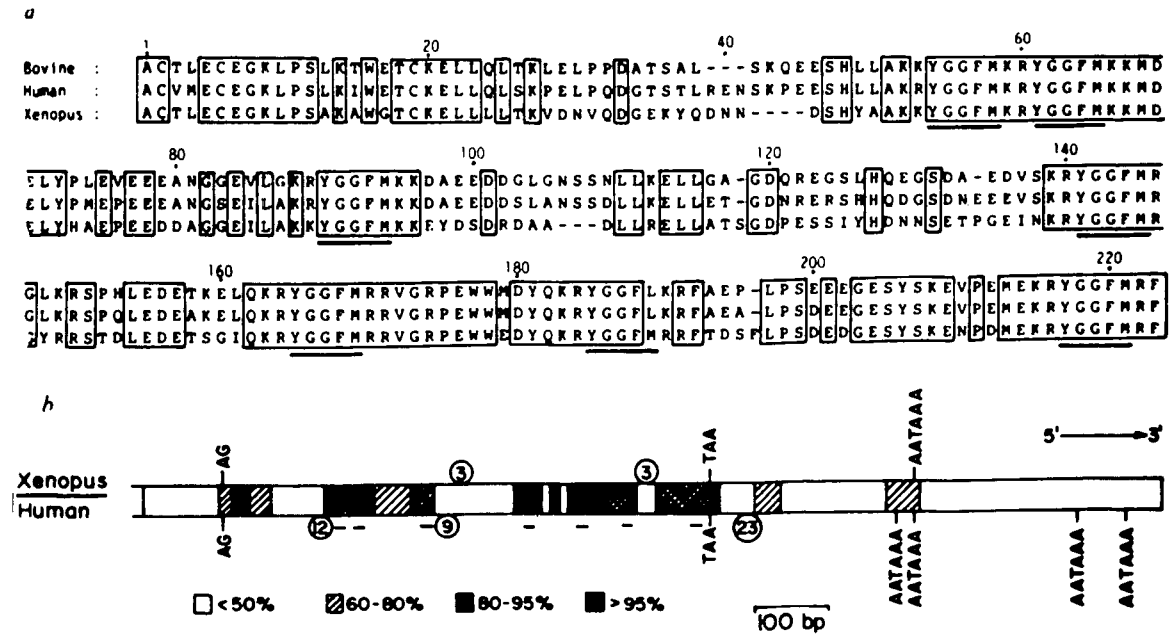

Figura 4. a) Homologías entre las secuencias aminoácidas de la PEF de mamíferos y Xenopus laevis. Se alinean las secuencias aminoácidas (usando la nomenclatura de una letra por aminoácido, según acuerdo en bioquímica) de la PEF de bovinos, humanos y Xenopus. Las zonas donde las secuencias son idénticas se han incluido en un recuadro y la localización de las encefalinas se señala con una línea continua en la parte de abajo de cada serie de secuencias (se observan 7 secuencias). b) Representa el grado de homología de la secuencia nucleótida entre los principales exones y sus extremos limitantes entre los genes de la PEF en Xenopus y humanos. Se indican los sitios putativos de poliadenilación (AATAAA), terminación (TAA) y *splicing* (AG). (reproducido de Martens, y Herbert (50).

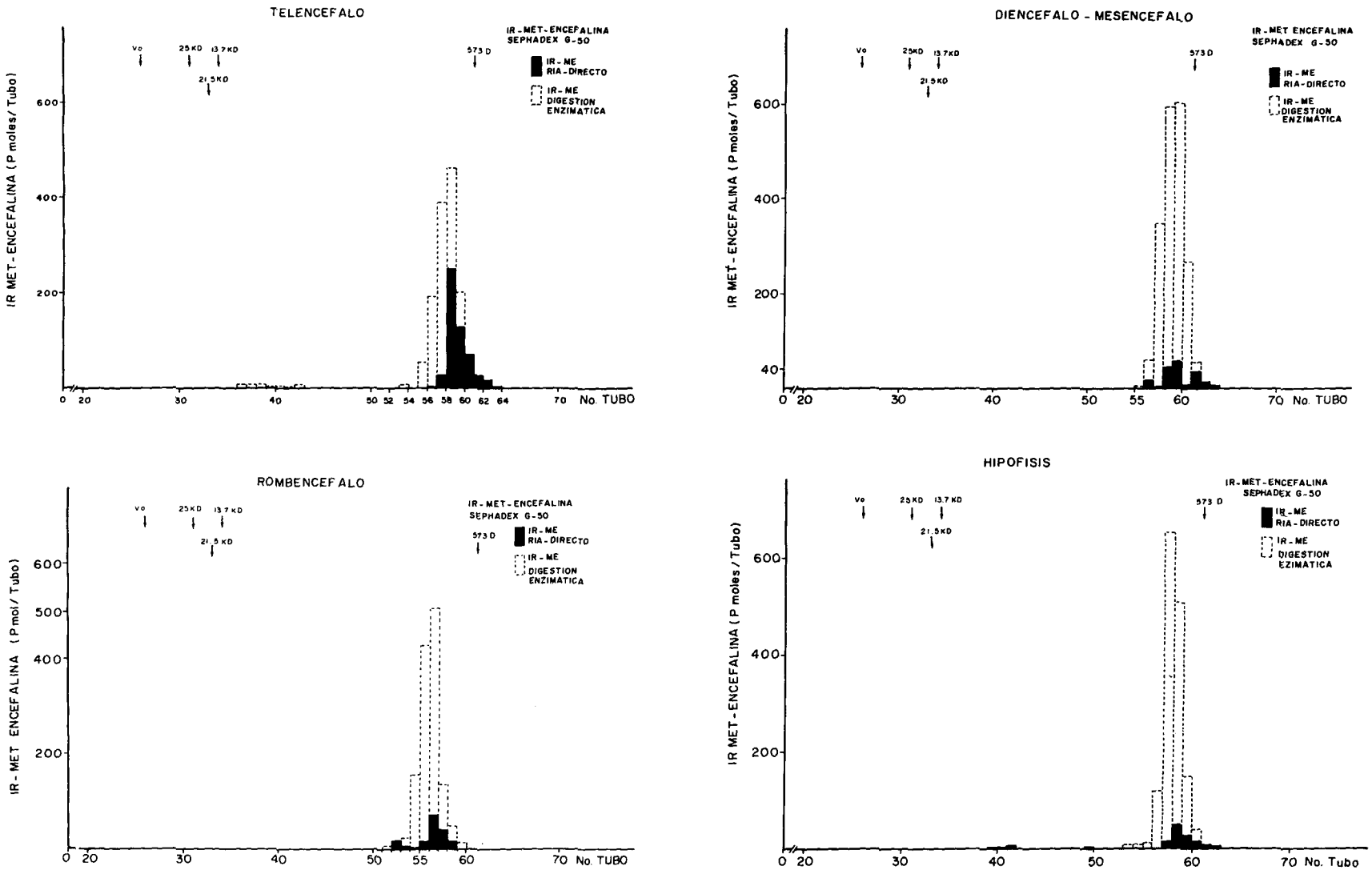

Figura 5. Inmunorreactividad para ME, resultante de la cromatografía de filtración molecular en gel de Sephadex G-50 para los extractos ácidos de telencéfalo, diencéfalo-mesencéfalo, rombencéfalo e hipófisis de *A. mexicanum* antes (■) y después (□) de digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. En la parte superior se indican los valores del los marcadores de peso molecular. BSA = 68 KD = Vo = volumen muerto; Quimiotripsinógeno = 25 KD; inhibidor de tripsina = 21.5 KD; ribonucleasa A = 13.7 KD y 3H-Met-encefalina = 573 Daltons. KD kilodaltons.

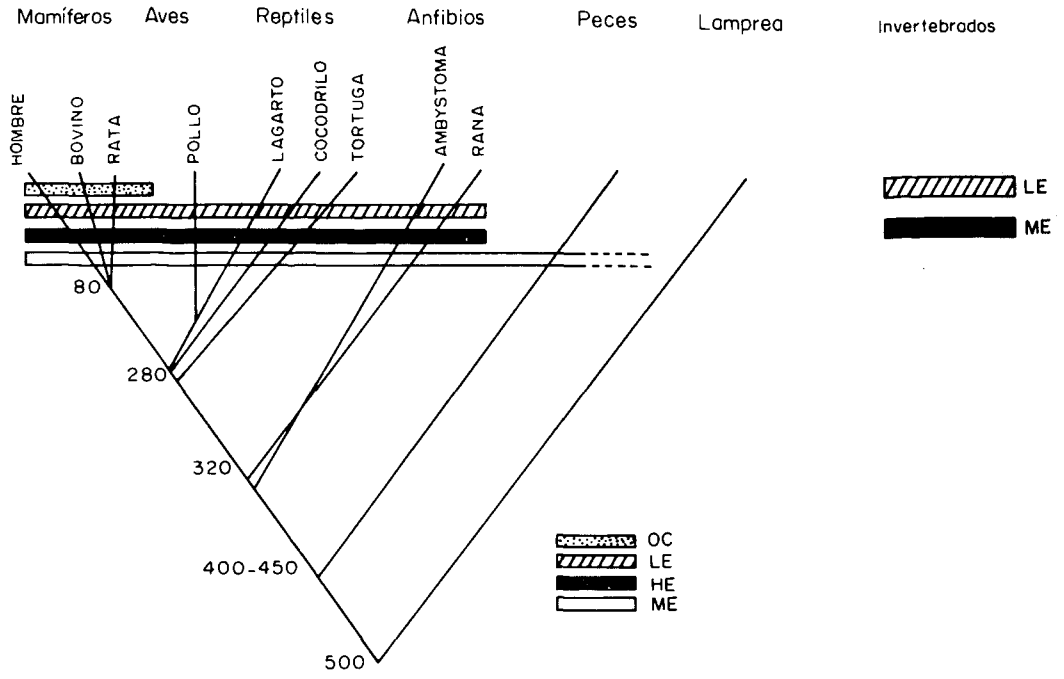

Figura 6. Cladograma de la evolución de los vertebrados, mostrando la presencia de encefalinas, HE y OC en varias especies. Los números indican hace cuántos millones de años se presentaron las divergencias. (Modificado de Lindberg y colaboradores (46).

(9). Esto indicaría que en el cerebro del axolotl, el procesamiento del precursor podría incluir una baja proporción de intermediarios de alto peso molecular, y los principales productos del precursor serían péptidos de bajo peso molecular, como LE, ME, HE, ME-Arg-Gly-Tyr. Datos que son congruentes con los resultados del procesamiento de la PEF en el cerebro de mamíferos (60) y reptiles (46), a diferencia de la médula adrenal en mamíferos, donde la cantidad de intermediarios de alto peso molecular que contienen encefalinas, respecto a las encefalinas libres, es relativamente mayor (24,26).

Se observaron diferencias regionales significativas en la concentración de ambas encefalinas, principalmente al comparar las regiones encefálicas con las concentraciones de la glándula hipófisis; del mismo modo que hemos demostrado para *A. tigrinum* (15,16).

Más recientemente, se ha demostrado mediante IHQ la presencia de IR para las encefalinas en algunas fibras de la eminencia media, el lóbulo neural y el lóbulo anterior de la hipófisis de *A. mexicanum* (42). Cabe señalar que en este estudio de encuentra por vez primera la existencia de IR-LE en el lóbulo anterior de un vertebrado.

Otro aspecto a considerar con respecto al sistema de la PEF en anfibios es que la existencia de LE se ha demostrado en el cerebro de *Bufo marinus* (37) la retina de *A. tigrinum* (74); el encéfalo y la hipófisis de *A. mexicanum* (2,9,42) y *A. tigrinum* (15) así como en cerebro de *Xenopus laevis* (64); sin embargo, la PEF en el anfibio, *Xenopus laevis* no contiene LE (50). Se ha planteado que en anfibios la LE podría provenir de un precursor distinto a la PEF, por ejemplo de la PDF, que contiene en su secuencia 3 copias de LE (71). En algunos tejidos de mamíferos se considera que la LE podría tener un doble origen; a partir de la PEF y de la PDNF (76) y la existencia del sistema de la prodinorfina se ha evidenciado en anfibios (18,64).

Prodinorfina (PDNF)

Los péptidos derivados de la PDNF, se encuentran distribuidos similarmente en el cerebro de sapo *Bufo marinus* que en la rata (18). Con valores más altos en la *pars* intermedia, con cantidades sustanciales en el cerebro y la médula espinal. Al igual que en el caso de los péptidos derivados de la PEF y de la POMC, la concentración resultó ser mayor que en cerebro de rata. Lo anterior concuerda con el hecho de la poca o nula cantidad de corteza cerebral que los anfibios presentan. En un estudio más reciente, se demostró la existencia de diferentes productos de la PDNF en el cerebro de *Xenopus laevis* con mayores concentraciones de alfa-neoendorfina (64). En este estudio se detectó también IR-LE, ya que la PEF de *Xenopus laevis* no contiene LE (50) los resultados sugieren también que la LE podría provenir de la PDNF y de sus péptidos derivados (64). Recientemente, hemos cuantificado la concentración de din-1-8 en el telencéfalo de *A. mexicanum* (Cano y cols., datos no publicados), lo que indica que el sistema de la PDNF también se localiza en anfibios urodelos y que la IRLE que hemos cuantificado en el cerebro y la hipófisis de *A. mexicanum* y *A. tigrinum* podría provenir de la PDNF.

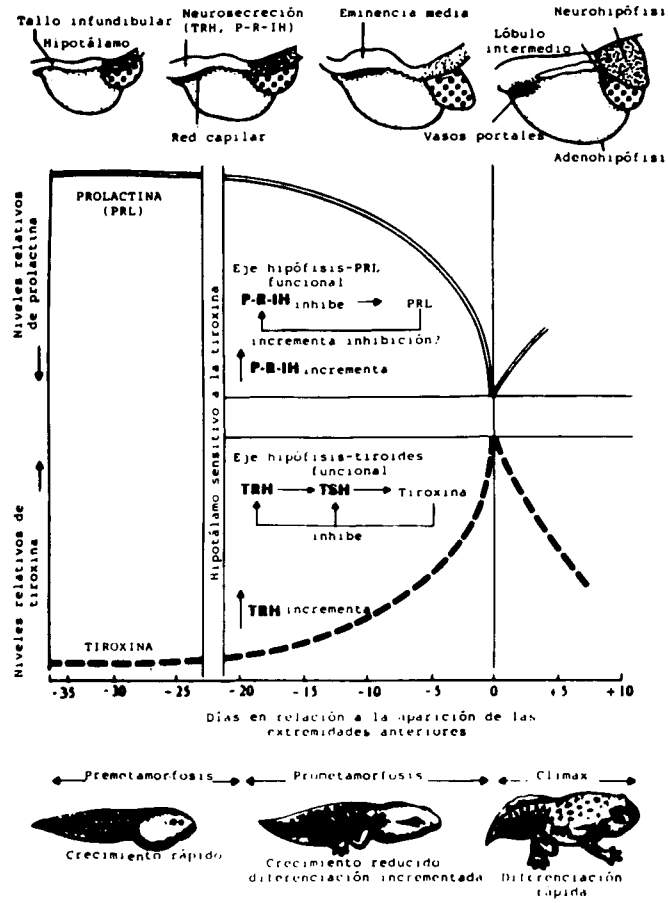

Figura 7. Representación de la regulación hormonal de la metamorfosis. Incluye el desarrollo de la hipófisis y el establecimiento de sus conexiones con el hipotálamo (extremo superior). Los cambios en la actividad y concentración hormonal dependiente del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (parte intermedia) y los cambios morfológicos globales del organismo (parte inferior). Los principales cambios en los sistemas de secreción neuroendócrina se presentan en la parte intermedia del proceso. (Reproducido de Bentley 5).

Dermofina (DMF)

En el caso de la dermofina (25) y deltorfina (36), de la piel de *Phylomedusa sauvagei* que como ya se ha mencionado difieren claramente de la secuencia de los péptidos opioides cerebrales en mamíferos, se ha evidenciado la existencia de un sistema de síntesis equivalente a los otros tres sistemas; es decir, a partir de un precursor común, del cual ya se conoce su secuencia nucleótida, y que da lugar a los péptidos activos a través de un procesamiento postraduccional (25,36,61). Cada péptido bioactivo está limitado por pares de aminoácidos básicos al igual que en los otros sistemas de precursores (61).

Dermofina
Lis-Arg-Tyr-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-Gly-Glu-Lys

Deltorfina
Lys-Arg-Tyr-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-Gly-Glu-Lys

Una característica común de estas secuencias con los otros péptidos con actividad opioide, incluyendo la casomorfina, es la presencia del aminoácido tirosina en el extremo amino terminal, que al parecer es importante para el sitio de reconocimiento de los receptores opioides (56).

III. Posible significado filogenético

El polimorfismo estructural observado en los genes que codifican para los precursores de péptidos opioides en los mamíferos, también se observa en los anfibios (50) (fig. 4). Los precursores presentan un tamaño equivalente y unidades repetitivas dentro de su secuencia. Se ha considerado que la duplicación de secuencias cortas de ADN dentro de un gene, podría ocurrir durante la evolución, del mismo modo que la presencia de pares de aminoácidos básicos que limitan

a los productos biológicamente activos, que mediante el procesamiento postraduccional serán separados del precursor; aspectos que se consideran desarrollados en paralelo con los grupos de enzimas que hidrolizan pares aminoácidos básicos, en los distintos tipos de proteínas precursoras que se encuentran altamente conservados en la evolución (1).

La multiplicidad de péptidos bioactivos de cada uno de precursores opioides, se podría correlacionar con la existencia de más de un tipo de receptor opioide (mu, delta, kappa) y los subtipos de éstos (56). Algunos estudios comparativos, de unión a receptor *in vitro*, han encontrado una tendencia evolutiva en el grado de afinidad de los receptores; los sitios con alta afinidad se encuentran con mayor frecuencia en las especies más recientes en la escala filogenética (6,23). La proporción de receptores mu/delta en homogenados es más grande en ratas; intermedia en tortugas y ranas; y muy baja en pez dorado (6).

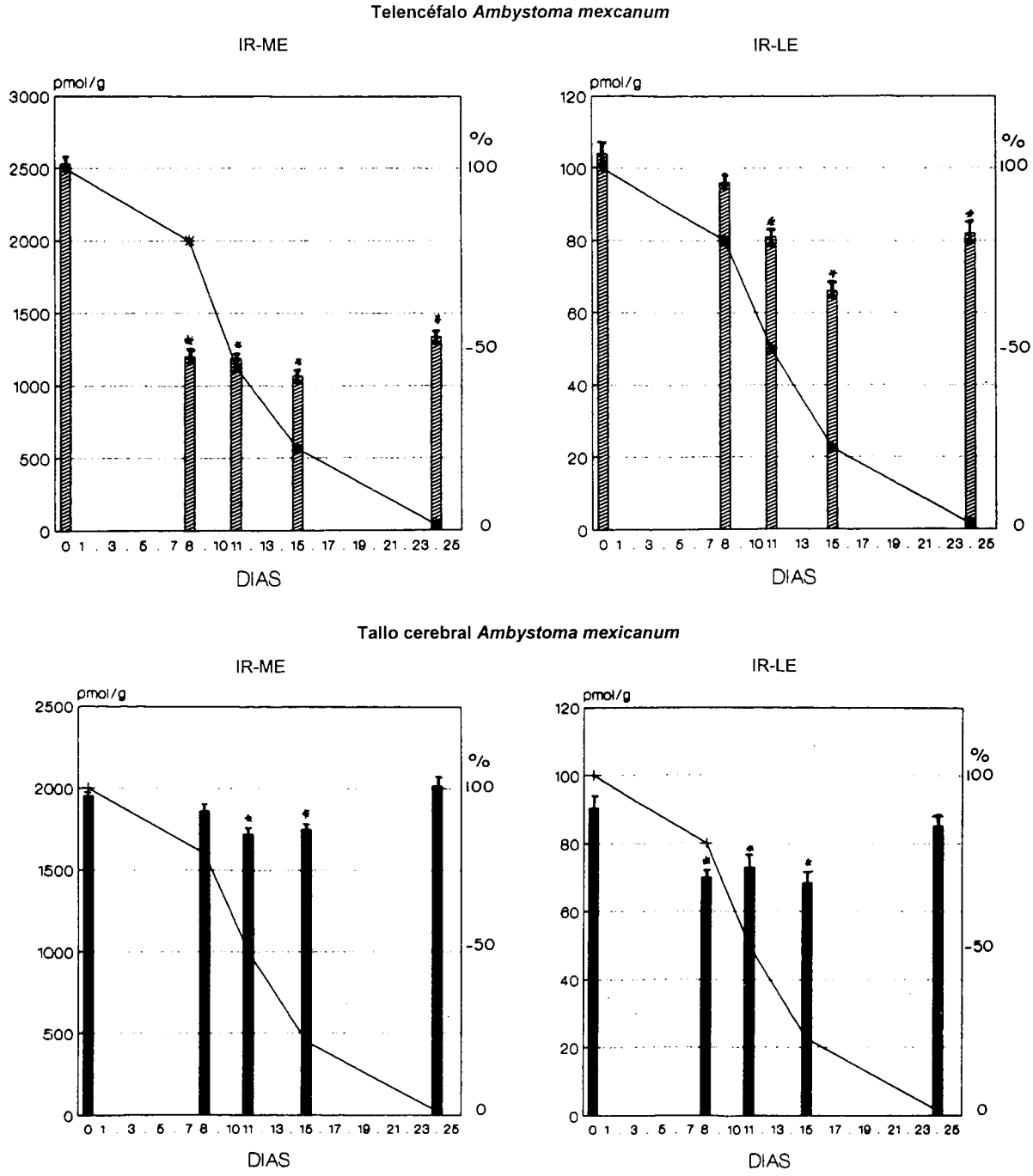

Figura 8. Cambios en la concentración de encefalinas (barras) en el telencéfalo y el tallo cerebral de *A. mexicanum* en relación a la disminución en la longitud de branquias (línea continua) a 8, 11, 15 y 24 días después del rompimiento de la neotenia mediante la administración de T4. En el extremo derecho de cada gráfica se anota la escala en % para la longitud de branquias. * = $P < 0.005$.

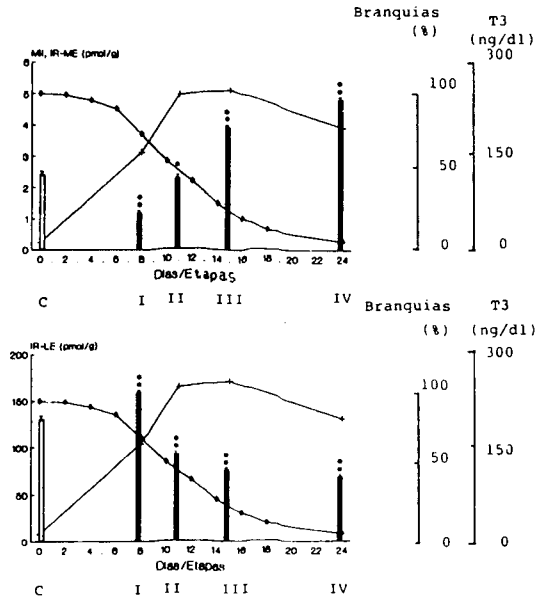

Figura 9a. Concentración de inmunorreactividad para las encefalinas (ME y LE) (pmol/g) (barras), en el diencéfalo de *A. mexicanum* en relación a los niveles circulantes de T3 (ng/dl) (+++) y la reducción de branquias (%) (----), durante la metamorfosis T4-inducida. Las barras blancas corresponden a los valores de los grupos control (sin T4) y las obscuras a las etapas de la metamorfosis (I-IV) * = P < 0.009, ** = P < 0.000 en comparación con el grupo control.

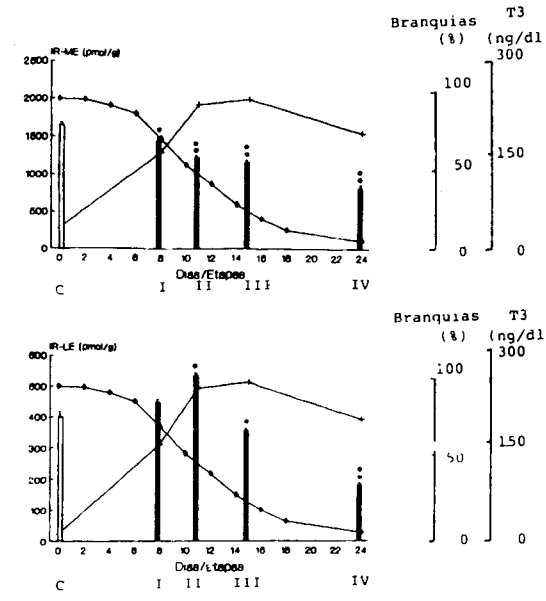

Figura 9b. Concentración de inmunorreactividad para las encefalinas (ME y LE) en la glándula hipófisis de *A. mexicanum* a lo largo de la metamorfosis T4-inducida. El resto de la leyenda es igual que en la figura 9a.

En mamíferos se ha sugerido que los receptores mu y delta median el efecto de los opioides en la actividad nociceptiva y respiratoria, respectivamente (55). La carencia de receptores mu en *goldfish*, (pez dorado) es interpretada como que la antinocicepción mediada por los sistemas opioides, pudo desarrollarse por vez primera en los anfibios (6). Adicionalmente en un estudio ontogenético, se encontró que conforme se avanza en el desarrollo de la rata, se observa una tendencia hacia valores más altos en la proporción de receptores mu/delta (6); resultados que se confirman en homogenados de estriado de mamíferos y el tejido correspondiente de vertebrados no mamíferos; la proporción de receptores mu fue mayor con respecto a los delta solamente en las especies de sangre caliente. En *Rana esculenta* y la tortuga *Pseudemys scripta* la proporción de cada uno fue equivalente (23).

Los estudios bioquímicos indican que en el cerebro de los anfibios analizados, los receptores kappa son los que se encuentran en mayor proporción (65,66); lo que hace pensar en la realización de estudios de unión a receptor en los que se utilicen agonistas y antagonistas kappa, y así, corroborar la tendencia que proponen los estudios con agonistas mu y delta.

Respecto al origen y evolución de los sistemas precursores se han planteado diferentes hipótesis: en un estudio teórico comparativo, Lewis y Erickson (45), plantean que la PDNF y la PEF, podrían haber evolucionado a partir de un gene ancestral común; sin embargo, se considera que la unidad de duplicación genética de los sistemas opioides fue la ME, ya que es la secuencia común a los tres sistemas de precursores opioides descritos en mamíferos, y su existencia se ha evidenciado en todos los animales examinados (45).

Lindberg y cols. (46) por su parte, sugieren una posible secuencia temporal de cambios en cuanto al sistema de la PEF. Se considera que a partir de una unidad de duplicación ME, se formó el HE y después la LE y el OC (fig. 6). Por el hecho de encontrar bajas concentraciones de LE en cerebro completo de anfibios y no encontrar IR-OC ni en anfibios, ni en reptiles, se plantea que en reptiles la PEF podría ser distinta a la de mamíferos y anfibios, y que tal vez el OC no existe en la PEF o está en una forma no reconocible por el anticuerpo, como ocurre en anfibios, donde el último aminoácido del OC es Tyr y no Leu. También se sugiere que la LE aparece en reptiles y el OC hasta en aves (46), aspecto que no es concordante con la demostración de IR para OC y LE en *Helix aspersa* (30,43), ya que esta última especie es un molusco, y como grupo taxonómico, se sabe que surgió antes que cualquier vertebrado. Será importante corroborar la presencia de IR-OC, IR-LE en otras especies de in-

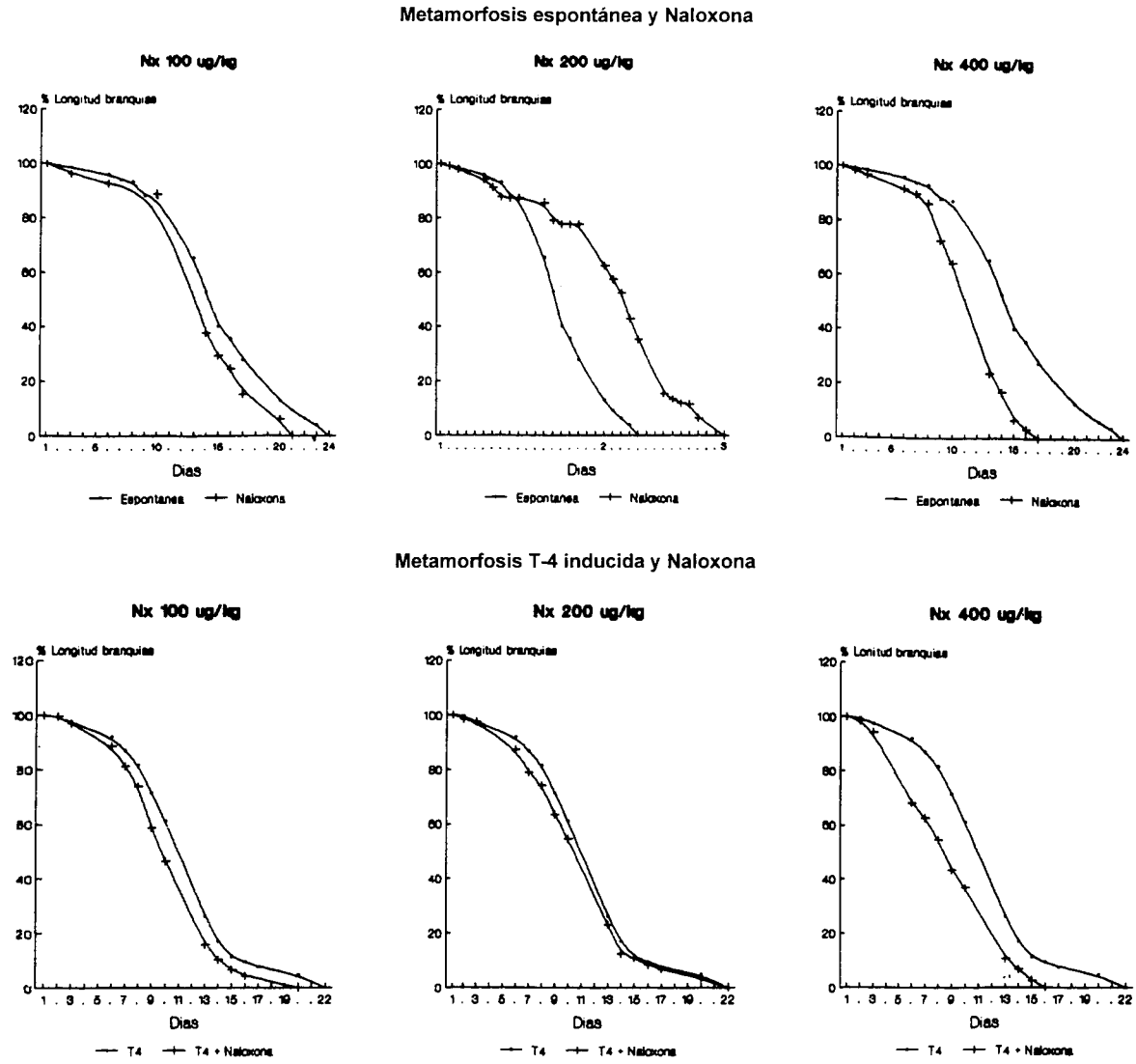

Figura 10. Efecto de la naloxona sobre la metamorfosis espontánea (1) e inducida (2) en *A. tigrinum*. La administración de naloxona fue intraperitoneal (ip) cada tercer día. En el grupo 2 la metamorfosis se indujo con una sola inyección ip de T4 (1.25 ug/g) y la administración de naloxona como se ha indicado para el grupo con naloxona sola. Se observa un efecto diferencial de la naloxona sobre la metamorfosis dependiente de la dosis utilizada. El efecto retardante que la naloxona sola tiene a una dosis de 200 ug de naloxona/kg se elimina cuando se administra T4, que es un estimulante de la metamorfosis.

vertebrados, ya que existe la posibilidad de cruzamiento no identificado en los estudios anteriores, pero sobre todo, conseguir la secuencia nucleótida del gene que codifica para la PEF y la PDNF en invertebrados.

IV. Posible significado fisiológico

Desde principios de los ochenta, se han aportado evidencias indicativas de la presencia y posibilidad de que los sistemas de péptidos opioides en vertebrados no mamíferos, pudiera ejercer efectos equivalentes a los descritos en los mamíferos. El comportamiento termorregulador en pez dorado y lagarto (35), al parecer depende de un mecanismo opioide. En anfibios se ha relacionado a los opioides en la regulación de la nocicepción (68), con la actividad locomotora (19); con la regulación de la actividad sexual (20); y con la metamorfosis (13).

Nocicepción

Se sabe que los nociceptores cutáneos en la piel de ranas son similares a los encontrados en mamíferos (68).

La administración subcutánea (20, 60 o 100 mg/kg) o sistémica (10 o 100 mg/kg) de morfina en ranas, ocasionó un efecto nociceptivo en la prueba de rejilla eléctrica o plancha caliente (53), y un incremento en el umbral nociceptivo en la prueba del ácido acético en *Rana pipiens* (69).

En otro estudio, mediante la inyección de morfina y otros alcaloides, directamente en la médula espinal de ranas no anestesiadas, se demostró una acción nociceptiva potente; se encontró que en ranas no se observan los efectos motores que se observan en los mamíferos al administrar morfina intraespinal, porque la dosis utilizada para los efectos nociceptivos en anfibios son más bajas que las necesarias para los efectos motores (59).

La administración de concentraciones nanomolares de opioides (ME, beta-endorfina y dinorfina) a nivel espinal, también produce un incremento en el umbral nociceptivo de manera dosis-dependiente en *Rana pipiens* (70). Estos resultados indican la posible participación de receptores delta, mu y kappa en el proceso nociceptivo de los anfibios. Además, en anfibios, la administración de dinorfinas no produce las marcadas disfunciones que estos péptidos ocasionan en ratas, y el efecto antinociceptivo que produce es potente y sin ningún efecto motor distinguible (70).

Actividad locomotora

Existen evidencias que indican que los mecanismos opioides juegan un papel en el control en la actividad locomotora en los vertebrados (54,72). En anfibios anuros, la administración de altas dosis de opiáceos produce comportamiento motor explosivo y rigidez muscular generalizada (59). Adicionalmente en anfibios urodelos, la administración de bremazocina (agonista kappa) en machos del anfibio urodelo Taricha granulosa, reduce la actividad locomotora espontánea de manera dosis dependiente; mientras que la naloxona, estimula la locomoción de manera dosis dependiente en forma aguda; de modo contrario a lo generalmente observado en otros vertebrados, en donde la naloxona reduce la actividad motora (72). De hecho, la naloxona sola (5 ug/kg + 350 ug/kg; equivalente a la dosis que afecta la locomoción en mamíferos) estimuló la actividad locomotora y contrarrestó el efecto inhibitorio de la bremazocina sobre la locomoción (19). Se considera que la estimulación de la locomoción en anfibios por la naloxona y su inhibición por la bremazocina, resulta del efecto de las dos drogas sobre tipos de receptores opioides separados.

Una explicación alternativa es que la bremazocina en Taricha granulosa altere la locomoción de manera indirecta, vía la modulación de la secreción del factor liberador de la corticotropina (FLC), que se sabe modifica la locomoción tanto en mamíferos como en anfibios (48). Sin embargo, en otro estudio se demostró que la bremazocina suprime la actividad locomotora espontánea, pero no la locomoción inducida con FLC en este anfibio. Además, la inyección de morfina (agonista mu) no afectó la actividad motora espontánea, pero redujo la locomoción inducida por FLC; lo cual indica que los receptores mu podrían modular los efectos del FLC en anfibios pero no los efectos que la bremazocina ejerce.

Se concluye que los receptores kappa participan en la regulación de la locomoción en anfibios, pero no modulan la influencia del FLC sobre este comportamiento (48).

Metamorfosis

Por medio de RIA se encontraron diferencias regionales significativas en la concentración de las encefalinas (ME y LE), en el cerebro y la glándula hipófisis de organismos neoténicos de la especie *A. mexicanum* (2,9). Las diferencias presentaron una significancia mayor al comparar los valores de concentración entre las regiones encefálicas (telencéfalo, diencéfalo rombencéfalo) y la glándula hipófisis, donde las proporciones entre ambas encefalinas (ME:LE) fueron: 9:1 en las regiones encefalinas y de 2:1 en la hipófisis.

El mismo perfil, en cuanto a las diferencia regionales se observó, tanto en organismos juveniles como en adultos neoténicos de la especie *A. tigrinum*; además, en esta especie se identificaron diferencias significativas en la concentración de ambas encefalinas antes y después de la metamorfosis (16).

Tomando en cuenta que *A. mexicanum* es un anfibio neoténico obligado inducible, que no se metamorfosea ni en su habitat, ni en condiciones de laboratorio (a menos que se le induzca de manera experimental), se efectuó un estudio sobre los cambios en la concentración de encefalinas cerebrales e hipofisiarias durante cuatro etapas de la metamorfosis, definidas con base en parámetros morfométricos (14); ya que los cambios más importantes en la secreción de los mensajeros químicos que participan en la metamorfosis de anfibios, ocurren en la parte intermedia del proceso más que en los extremos (5, 38) (fig. 7).

Como ya se mencionó, *A. mexicanum* es una especie neoténica, que alcanza la madurez sexual sin cambiar sus hábitos y morfología larvaria; sin embargo, la neotenia puede eliminarse si los organismos son tratados con hormonas tiroideas (triiodotironina [T3]), tiroxina [T4]) o tirotropina (TSH) (38).

La concentración de ambas encefalinas disminuye en las etapas intermedias de la metamorfosis en el tallo cerebral y reducen en el telencéfalo de *A. mexicanum* cuando se elimina la neotenia mediante la administración de T4 (fig. 8) (11,14). En el diencéfalo, la concentración de ME se incrementa, mientras que la concentración de LE disminuye a lo largo de la metamorfosis (fig. 9a). En la hipófisis la concentración de ME disminuye gradualmente y la LE aumenta hasta la segunda etapa de la metamorfosis, y en las 2 últimas etapas, disminuye sus valores por debajo de los valores control (10,12) (fig. 9b). Los resultados de estos estudios indican que con la eliminación de la neotenia y el subsecuente desarrollo de la metamorfosis, además del incremento característico en los niveles circulantes de T3 (figs. 8 y 9) (12,38), también cambia el sistema encefalinérgico en el cerebro y la glándula hipófisis de *A. mexicanum*. Estos resultados son concordantes con los cambios observados en otros mensajeros químicos durante la metamorfosis de anfibios, como se ha observado para el FLC y la arginina vasotocina (AVT) en el cerebro de *R. catesbiana* (17); la acetilcolina en el cerebro de *Xenopus laevis* (63) y los gangliosidos cerebrales (31) con metamorfosis inducida en *A. mexicanum*.

Los cambios en todos estos sistemas pueden ser el resultado de la acción inicial de la tiroxina sobre el

genoma, y muy probablemente su significado tenga que ver con los mecanismos de ajuste fisiológico, morfológico y conductual que el proceso de metamorfosis implica (4).

De hecho se ha sugerido la posible regulación de los sistemas opioides por las hormonas tiroideas, en particular para el sistema de la POMC (27); cabria esperar que ocurriera también este tipo de regulación para la PEF y la PDNF en los anfibios, así que los cambios en la concentración de encefalinas que hemos obtenido con la metamorfosis tiroxina-inducida en *A. mexicanum* podría relacionarse con los cambios en su tasa de liberación y síntesis como respuesta a los ajustes fisiológicos que cada una de las estructuras cerebrales y la glándula hipófisis regula durante la metamorfosis.

En los anfibios, la metamorfosis es uno de los procesos biológicos más relevantes y cuya regulación es neuroendócrina. Es probable que las encefalinas y otros péptidos opioides participen en los procesos de regulación neuroendócrina, a través de la modulación de la secreción de otros mensajeros químicos que participan en la metamorfosis, por ejemplo de la PRL y la TSH que forman parte del mecanismo hormonal de la metamorfosis (5). Por otro lado, en mamíferos se ha encontrado que las encefalinas y otros opioides incrementan la secreción de PRL y pueden aumentar o disminuir la secreción de la TSH (24).

En un estudio reciente (13) encontramos que la naloxona (100 y 400 ug/kg) acelera la metamorfosis espontánea de *A. tigrinum*, mientras que la dosis de 200 ug/kg la retarda. En los organismos con metamorfosis T4-inducida (1.25/ug/kg, una sola dosis ip), la naloxona no tiene efecto a una dosis de 200 ug/kg, a 100 ug/kg la acelera ligeramente, y a 400 ug/kg la metamorfosis se acelera de una manera más pronunciada (fig. 10), de tal manera que el efecto retardante que la naloxona (200 ug/kg) tiene sobre la metamorfosis espontánea, se elimina cuando la metamorfosis se induce con T4.

El efecto diferencial de la naloxona sobre el desarrollo de la metamorfosis de *A. tigrinum*, permite considerar la hipótesis de la participación de los péptidos opioides endógenos en la regulación de la metamorfosis vía su unión a los receptores opioides, con la posibilidad de una regulación diferencial relacionada con la participación de más de un tipo de receptor.

Conclusiones

En los anfibios es clara la presencia de los distintos tipos de receptores opioides y de los péptidos opioides endógenos derivados de la POMC, la PEF, la PDNF y la prodermofina. Es común encontrar valores más altos en la concentración tisular en el SNC de los ligandos opioides endógenos en anfibios, en comparación con mamíferos, situación que muy probablemente se relaciona con la carencia de corteza cerebral en anfibios. La posible tendencia en la expresión de los receptores opioides en asociación con alguna función en los diferentes grupos de vertebrados nos indica la importancia filogenética y biológica de los sistemas de péptidos opioides en los distintos grupos de vertebrados.

Los anfibios como modelo de estudio de los péptidos opioides, resultan muy atractivos, ya que presentan un sistema nervioso con una complejidad neuronal reducida y con las características anátomo-funcionales básicas de todos los vertebrados, y que dieron origen a la complejidad que observamos en los mamíferos.

Adicionalmente las células nerviosas de los anfibios urodelos se caracterizan por ser células de gran tamaño, lo que facilita los registros electrofisiológicos unitarios.

En particular, el estudio sobre la participación de los opioides en la nocicepción, ha demostrado que los anfibios representan un modelo más limpio, en el que se separa claramente el efecto que tienen los opioides, opiáceos y antagonistas del efecto que ejercen sobre la actividad locomotora (68).

La metamorfosis, como proceso biológico, puede considerarse tanto como un modelo de estudio sobre la participación de los opioides en la regulación neuroendócrina en los vertebrados, así como objeto de estudio en cuanto a la posible participación de los opioides en la regulación de la metamorfosis. Nuestros resultados permiten plantear que en el encéfalo y la hipófisis de *A. mexicanum* y *A. tigrinum* podrían existir los diferentes tipos de receptores opioides descritos en mamíferos, y que probablemente en estos anfibios urodelos exista un tipo predominante de receptor, como se ha demostrado en anfibios anuros (65,66). Por lo tanto, las encefalinas y otros péptidos opioides pudieran liberarse diferencialmente durante las diversas situaciones fisiológicas de la metamorfosis, y ejercer algún efecto modulador por su unión a los receptores correspondientes.

Resulta muy interesante la existencia de la dermofina y deltorfina en la piel y cerebro de *Phylomedusa sauvagei*, pero sobre todo el hecho de que la deltorfina es un ligando opioide que ocurre naturalmente y presenta los valores de afinidad y selectividad más altos para receptores delta que se han observado hasta la fecha (36). Incluso se considera que la dermofina y la deltorfina aisladas de la piel de *Phylomedusa sauvagei*, podrian representar la más apropiada, potente y selectiva herramienta para estudios farmacológicos de receptores mu y delta respectivamente (36).

Agradecimientos

A los integrantes del Laboratorio de Análisis Químicos por su apoyo en el desarrollo de los experimentos.

El proyecto al que pertenece este trabajo recibió apoyo del CONACYT asignado al autor, clave: DIII903854.

REFERENCIAS

1. ACHER R: Common patterns of neuroendocrine integration in vertebrates and invertebrates. *Gen Comp Endocrinol*, 61:452-458, 1986.
2. 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.
3. AUDIGER Y, DUPRAT A, CROS J: Comparative study opiate and enkephalin receptors on lower vertebrates and higher vertebrates. *Comp Bichem Physiol*, 67C:191-193, 1988.
4. BAKER B, TATA J: Prolactin prevents the autoinduction of thyroid hormone receptor mRNA during amphibian metamorphosis. *Ann Physiol*, 149:463-467, 1992.
5. BENTLEY P: *Comparative Vertebrate Endocrinology*. Cambridge University Press. Londres, 1976.
6. BUATTI M, PASTERNAK G: Multiple opiate receptors: phylogenetic differences. *Brain Res*, 218:400-405, 1981.
7. BUFFA R, SOLLCIA E, MAGNONI E, RIDI G, NEGRI L, MECHIORRI P: Immunohistochemical demonstration of a dermophine-like peptide in the rat brain. *Histochemistry*, 76:273-276, 1982.
8. BUCHAN A: An immunohistochemical study of regulatory peptides in the amphibian gastrointestinal tract and brain. *Can J Zool*, 64:1-7, 1986.
9. CANO A: Biosíntesis de encefalinas en el cerebro del ajolote *Ambystoma mexicanum*. Tesis Profesional de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México, 1987.
10. CANO A, ASAI M: 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). *Anales*. Instituto Mexicano de Psiquiatría, 4:23-30, 1993a.
11. CANO A, ASAI M: Rompimiento de la neotenia en*Ambystoma mexicanum* y los cambios en la concentración de encefalinas (ENKS) en telencéfalo y tallo cerebral. *Con Nac Cien Fisiol* XXXV:C171, México, 1992.
12. CANO A, ASAI M, VALVERDE R, ACEVES C: Diencephalon and pituitary enkephalins levels in *Ambystoma mexicanum* at various stages of thyroxine-induced metamorphosis. *Comp Biochem Physiol*, 1994 (en prensa).
13. CANO A, MATAMOROS G, ASAI M: Efecto de la administración de la naloxona sobre el desarrollo de la metamorfosis en *Ambystoma tigrinum*. *Cong Nac Cien Fisiol*, XXXVI:C34, México, 1993b.
14. CANO A, VARGAS A, ASAI M: Determination of metamorphic stages in the axolotl *Ambystoma mexicanum*. International workshop on the molecular biology of axolotls and other urodels, Indiana University USA, 1:9, 1993c.
15. CANO A, VARGAS A, MATAMOROS G, TALAVERA E, SANDOVAL A, PATIÑO C, AVILA ME, ASAI M: Direferencias regionales en la concentración de IR-Met- y IR-Leu-encefalina en el cerebro y la hipófisis del anfibio urodelo *Ambystoma tigrinum* antes y después de la metamorfosis. *Anales*. Instituto Mexicano de Psiquiatría, 1:101-110, 1990a.
16. CANO A, VARGAS A, MATAMOROS G, ANTON-TAY F, ASAI M: Regional brain and pituitary enkephalins changes with age and metamorphosis in *Ambystoma tigrinum*. *20 th An Meet Soc Neurosci*, 16:876, 1990b.
17. CARR J, NORRIS D: Immunohistochemical localization of cortocotropin-releasing factor and arginine vasotocinlike immunoreactivies in the brain and pituitary of the American bulfrog *Rana catesbiana* during development and metamorphosis. *Gen Comp Endocrinol*, 78:180-188, 1990.
18. CONE R, GOLDSTEIN A: A dynorphin-like opioid in the central nervous system of an amphibian. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:3345-3349, 1982.
19. DEVICHE P, LOWRY C, MOORE F: Opiate control of spontaneous locomotor activity in a urodele amphibian. *Pharmacol Biochem Behav*, 34:753-757, 1989.
20. DEVICHE P, MOORE F: Opioid kappa-receptor agonists suppress sexual behaviors in male rough-skinned newts (*Taricha granulosa*). *Hormon Behav*, 21:371-383, 1987.
21. DOERR-SCHOTT J, DUBOIS M, LICHTE C: Immunohistochemical localization of substances relative to antisera against alpha and beta-endorphin and met-enkephalin in brain of *Rana temporaria*. *Cell Tissue Res*. 217:79-92, 1981.
22. DORES R, ROTHENBERG M: Isolation of immunoreative b-endorphin- related peptides from the posterior pituitary of the amphibian, *Xenopus laevis*. *Peptides*. 8:1119-1125. 1987.
23. EDLEY S, HALL L, HERKENMAN M, PERT C: Evolution of striatal opiate receptors. *Brain Res*, 249:184-188, 1982.
24. EIDEN L: The enkephalin-containing cell: Strategies for polypeptide synthesis and secretion throughout the neuroendocrine system. *Cell Mol Neurol*, 7:339-352, 1987.
25. ERSPAMER V: The opioid peptides of the amphibian skin. *Int J Dev Neurosci*, 10:3-30, 1992.
26. FLEMINGER G, EZNA E, KILPATRICK D, UDENFRIEND S: Processing of enkephalin-containing peptides in isolated bovine adrenal chromaffin granules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:6418-6421, 1983.
27. GAMBERT S, GARTHWAITE T, PATZER C, HAGEN T: Thyroid hormone regulation of central nervous system (CNS) beta-endorphin and ACTH. *Horm Metab Res*, 12:345-346, 1980.
28. GAUDINO G, FALOSO A, MERLO G, LAZARUS L, RENDA T, D'ESTE L, VANDESANDE F: Active peptides from amphibian skin are also amphibian neuropeptides. *Peptides*, 6(suppl 3):209-213, 1985.
29. GUTIERREZ R: Neurobiología de los opioides. *Ciencia México*, 43:47-61, 1992.
30. GUTIERREZ R, ASAI M: Ir-met and Ir-leu-enkephalin content in the periesophageal ganglia of *Helix aspersa*, seasonal variations. *Comp Biochem Physiol*, 100C(3):609-613, 1991.
31. HILBING R, SCHMITT M, RAHMAN A: Changes in brain gangliosides of the neotene and metamorphic (thyroxine-induced) newts axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Dev Neurosci*, 9:240-246, 1987.
32. HUGHES J: Biogenesis, release and inactivation of enkephalins and dynorphins. *Br Med Bull*, 39:17-24, 1983.
33. JACKSON I, BOLAFI J, GUILLEMIN R: Presence of immunoreactive beta-endorphin and enkephalin-like material in the retina and other tissues of the frog, *Rana pipiens*. *Gen Comp Endocrinol*, 42:505-508, 1980.
34. JEGOU S, TONON M, LEROUX P, LEBOULENGER F, PELETIER G, COTE J, LING N, VAUDRY H: Immunological characterization of endorphins, adrenocorticotropin, and melanotropins in the frog hypothalamus. *Gen Comp Endocrinol*, 51:246-254, 1983.
35. KAVALIERS M, INNES D, COURTENAY S, HIRST M: Opiates influences behavioral thermoregulation in the curlytailed lizard; *Leiocephalus carinatus*. *Physiol Behav*, 32:221-224, 1984.
36. KREIL G, BARRA D, SIMMACO M, ERSPAMER V, ERSPAMER G, NEGRI L, SEVERINI C-M, CORSI R, MELCHORRI P: Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for delta opioid receptors. *Eur J Pharmacol*, 162:123-128, 1989.
37. KILPATRICK D, HOWELLS R, LAHAM H-M, UDENFRIEND S: Evidence a proenkephalin-like precursor in amphibian brain. *Proc Natl Acad Sci* USA, 80:5772-5775, 1983.
38. KUHN E, JACOBS F: Metamorphosis. In: *Developmental Biology of Axolotl*. Armstrong y Malacinski G. (Ed.) Oxford University Press. Nueva York, 1989.
39. LEBOULENGER F, CHARNAY Y, DUBOIS P, ROSSIER J, VAUDRY H: Presence of proenkephalin in chromaffin cells of frog adrenal gland. *Neurochem Int*, 6:773-777, 1984.
40. LEBOULENGER F, CUPO A, CATANAS E, BENYAMINA M, PELLETIER G, VAUDRY H: Immunohistochemical and biochemical evidence for the presence of the pentapeptides met-enkephalin and the heptapeptide met-enkephalin-Arg6-phen7 but not the octapeptide Met-enkephalin-Arg6-

Gly7-Leu8 in amphibian chromaffin cells. *Neurochem Int*, 8:303-309, 1986.
41. LEBOULENGER F, LEROUX P, DALERUE D, TONON M, CHARNAY Y, DUBOIS P, COY D, VAUDRY H: Colocalization of vasoactive intestinal peptide (VIP) and enkephalins in chromaffin cells of adrenal gland of amphibian stimulation of corticosteroid production by VIP. *Life Sci*, 32:375-383, 1983.
42. LEON-OLEA M, SANCHEZ-ALVARES M, PIÑA A-L, BAYON A: Evidences for enkephalin- and endorphin-immunoreactive cells in the anterior pituitary of the axolotl*Ambystoma mexicanum*. *J Comp Neurol*, 305:412-420, 1991.
43. LEON-OLEA M: Los péptidos opioides como proteinas ancestrales: estudio inmunohistoquímico en el molúsco *Helix aspersa* y el anfibio *Ambystoma mexicanum*. Simposio Péptidos Opioides XXXVI Cong Nac Cien Fisiol, México, 1993.
44. LeROITH D, LIOTTA A, ROCH J, SHILOACH J, LEWIS M, PERT C, KRIEGER D: Corticotropin and beta-endorphin-like materials are native to unicellular organisms.*Proc Natl Acad Sci*, USA, 79:2086-2090, 1982.
45. LEWIS R, ERICKSON B: Evolution of proenkephalin and prodynorphin. *Amm Zool*, 26:1027-1032, 1984.
46. LINDBERG I, WHITE L: Reptilian enkephalins: Implications for the evolution of proenkephalin. *Arch Biochem Biophys*, 246:1-7, 1986.
47. LORENZ H, KEMALI M: Substance P, met-enkephalin, and somatostatin-like immunoreactivity distribution in the frog spinal cord. *Neurosci Lett*, 26:119-124, 1981.
48. LOWRY C, DEVICHE P, MOORE F: Effects of corticotropinreleasing factor (CRF) and opiates on amphibian locomotion. *Brain Res*, 513:94-100, 1990.
49. MARTENS G, GIVELLI O, HERBERT E: Nucleotide sequence of cloned CDNA for proopiomelanocortin in the amphibian *Xenopus laevis*. *J Biol Chem*, 260:13685-13689, 1985.
50. MARTENS G, HERBERT E: Polymorphism and absence of leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. *Nature*, 310:251-254, 1984.
51. MARTENS G, JENKS N, OVERBEEKE A: Biosynthesis of pair of peptides related to melanotropin, corticotropin and endorphin in the pars intermedia of the amphibian pituitary gland. *Eur J Biochem*, 122:1-10, 1982.
52. MONTECUCHI P, DeCASTIGLIONE P, PIANI S, GOZZINI L, ERSPAMER V: Aminoacid composition and sequence of dermophin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phylomedusa sauvagei*. *Int J Perotein Res*, 17:275-277, 1981.
53. NISTRI A, PEPEU G, CAMMELLI E, SPINA L, DeBELLIS A: Effects of morphine on brain and spinal acetylcholine levels and nociceptive threshold in the frog. *Brain Res*, 80:199-209, 1974.
54. OLSON G, OLSON R, KSATI K: Endogenous opiates. *Peptides*, 8:1135-1164, 1987.
55. PASTERNAK G, CHILDERS S, SNUDER S: Opiate analgesia: evidence for mediation by a subpopulation of opiate receptors. *Science*, 208:514-516, 1980.
56. PASTERSON S, ROBSON L, KOSTERLITZ H: Classification of opioid receptors. *Br Med Bull*, 39:31-32, 1983.
57. PERT C, APOSHIAN D, SNYDER S: Phylogenetic distribution of opiate receptors binding. *Brain Res*, 75:356-361, 1974.
58. PEZALLA P, SEIDAH N, BENJANNET S, CRINE P, LIS N, CHRETIEN M: Biosynthesis of beta-endorphin, beta-lipotropin, and the putative ACTH-LPH precursor in the frog pars intermedia. *Life Sci*, 23:2281-2292, 1987.
59. PEZALLA P, STEVENS C: Behavioral effects of morphine, levorphanol, dextrorphan, and naloxone in the frog *Rana pipiens*. *Pharmacol Biochem Behav*, 21:213-217, 1984.
60. PITTUS W, KLEY N, LOEFFLER J, HOLLT V: Quantitation of proenkephalin a messenger RNA in bovine brain, pituitary and adrenal medulla: Correlation between MRNA and peptide levels. *The EMBO J*, 4:1257-1260, 1985.
61. RICHTER K, EGGAR R, KREIL G: D-alanine in the frog skin peptide dermophine is derived from L-alanine in the precursor. *Science*, 238:200-202, 1887.
62. RUEGG U, CUENOD S, HILLER J, CUANNINI 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.
63. SCHLESINGER C: On the ontogenesis of the acethycholinesystem in the brain of South African Xenopus (*Xenopus laevis)* Daudin. *J Hirnforsch*, 22:543-553, 1981.
64. SEI C, RICHARD R, DORES R: Eteady-state levels of prodynorphin-related and products from the brain of the amphibian, *Xenopus laevis*. *Brain Res*, 479:162-166, 1989.
65. SIMON E, HILLER J, GROTH J, ITZHAK Y, HOLLAND M, BECK S: The nature of opiate receptors in the toad brain. *Life Sci*, 31:1367-1370, 1982.
66. SIMON J, SZUCZ M, BENYTHE S, BORSODIA, A, ZEMAN P, WOLLEMAN M: Solubilization and characterization of opioid binding sites from frog*Rana esculenta* brain. *J Neurochem*, 43:957-963, 1984.
67. SIMANTOV R, GOODMAN, R, APOSHIAN D, SNYDER S: Phylogenetic distribution of a morphine-like peptide "enkephalin". *Brain Res*, 111:204-211, 1976.
68. STEVENS C: Opioid antinociception in amphibians. *Brain Res Bull*, 21:959-962, 1988.
69. STEVENS C, PEZALLA P: A spinal site mediates opiate analgesia in frogs. *Life Sci*, 33:2097-2103, 1983.
70. STEVENS C, PEZALLA P, YAKSH T: Spinal antinociceptive action of three representative opioids in frogs. *Brain Res*, 402:201-203, 1987.
71. UDENFRIEND S, KILPATRICK D: Biochemistry of the enkephalins and enkephalin-containing peptides. *Arch Biochem Biophys*, 221:309-323, 1983.
72. UKAI M, KAMEYAMA T: The antagonistic effects of naloxone on hypermotility in mice induced by dynorphin-(l-13) using a multidimentional behavioral analysis. *Neuropharmacol*, 23:165-168, 1984.
73. VAUDRY H, JENKS B, OVERBEEKE V: Biosynthesis processing and release of pro-opiomelanocortin related peptides in the intermediate lobe of pituitary gland in the frog *Rana ridibunda*. *Peptides*, 5:905-912, 1984.
74. WATT C, LI W, FRY K, LAM D: Localization of enkephalin-like immunoreactive ammacrine cells in the larval Tiger salamander retina: A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, 24:171-179, 1985.
75. YIU R: Immunohistochemical studies on peptide neurons in the hypothalamus of the bullfrog Rana catesbiana.*Gen Comp Endocrinol*, 49:195-209, 1983.
76. ZAMIR N, PALKOVITS M, WEBER E, MESEY E, BROWN STEIN M: A dynorphinergic pathway of leu-enkephalin production in rat substantia nigra. *Nature*, 307:643-645, 1984.