

Los opioides como péptidos ancestrales: estudio inmunohistoquímico en el molusco *Helix aspersa* y en el anfibio *Ambystoma mexicanum*

Martha León-Olea*
Marcela Sánchez-Alvarez*
Eduardo Sánchez-Islas*

Summary

The variety of pharmacological, physiological and immunohistochemical experiments of opioid peptides have provided useful information in comparative biology research and have elucidated the functions in which these substances participate. Opioid peptides and their receptors have maintained a very stable structure through evolution. Besides, these peptides are widely distributed along the phylogenetic scale.

Our group has carried out immunohistochemical studies of opioid peptides in two different species: the snail *Helix aspersa* and the axolotl *Ambystoma mexicanum*. Our results on *Helix aspersa* have shown immunoreactivity to leu-enkephalin in interneurons of the sensorial pathway of the tentacle, interneurons of the parietal ganglia, and neurosecretory neurons of the mesocerebrum. The immunoreactivity to met-enkephalin is more widely distributed in the periesophageal ganglia. We found that the immunoreactivity to enkephalins has a seasonal variation. Using immunohistochemistry and HPLC techniques, the presence of the octapeptide Met-5-Arg-Gly-Leu in the snail was shown. Release of enkephalins in snail ganglia was triggered by a depolarization pulse, and was calcium dependent.

In *A. mexicanum*, the distribution of immunoreactivity to opioid peptides was reported. The immunoreactivity to met-enkephalin and dynorphin 1-8 was found in fibers of median eminence and posterior lobe. Immunoreactivity to leu-enkephalin was located in some fibers of the posterior lobe, median eminence, and in cells of the anterior hypophysis. This last site suggested that this peptide might play a hormonal role. The distribution of enkephalins in the brain of *A. mexicanum* was very similar to that found in mammals and other vertebrates. In telencephalon, positive cells and fibers were mainly found in the stria-amygdaloid nucleus and in the septal region. In diencephalon, the immunoreactivity to enkephalins was localized in habenula and hypothalamic nuclei.

Our data showed that the distribution of opioid peptides is similar to the one found in other organisms representing different taxonomic groups, and that they have similar physiologic functions within these groups.

Resumen

Existe una variedad de estudios multidisciplinarios de tipo farmacológico, fisiológico e inmunohistoquímico que han sido

* Laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica, División de Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calz. México Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco 14370, México D.F.

de gran utilidad en las investigaciones de la biología comparada de los péptidos opioides, y las posibles funciones en las que participan a lo largo de la escala filogenética. Se ha encontrado que estos péptidos y sus receptores específicos, se han mantenido estables a través de la evolución. Además, se ha demostrado que los opioides están distribuidos ampliamente a lo largo de la escala filogenética. Nuestro grupo ha realizado estudios inmunohistoquímicos para leucina encefalina, metionina encefalina, dinorfina 1-8 y beta-endorfina en dos especies: el caracol de jardín *Helix aspersa* y el ajolote *Ambystoma mexicanum*.

Los resultados obtenidos en el *Helix aspersa* mostraron inmunoreactividad a leucina encefalina en interneuronas de la vía sensorial del tentáculo, en interneuronas de los ganglios parietales, y en neuronas neurosecretoras del cuerpo dorsal del mesocerebro, principalmente. La inmunoreactividad a metionina encefalina tuvo una distribución más amplia. Se encontró que la inmunoreactividad a encefalinas tiene una variación estacional. Así mismo, se encontró por medio de inmunohistoquímica y HPLC, inmunoreactividad al octapéptido Met-5-Arg-Gly-Leu en el anillo periesofágico de este organismo. Se estudió la liberación de encefalinas en estos ganglios y se encontró que es provocada por alto potasio y dependiente de calcio.

En el *Ambystoma mexicanum* se demostró la existencia de inmunoreactividad a opioides en la hipófisis. La inmunoreactividad a metionina encefalina y a dinorfina, se encontró únicamente en fibras de la eminencia media y el lóbulo posterior; la inmunoreactividad a leucina encefalina se distribuyó en algunas fibras del lóbulo posterior y de la eminencia media, y en una gran cantidad de células del lóbulo anterior. Este último hallazgo sugirió que este péptido pudiera tener un papel hormonal. La distribución de encefalinas en el cerebro del *A. mexicanum* fue muy similar a la encontrada en los mamíferos y otros vertebrados. En telencéfalo, la concentración de fibras y neuronas inmunoreactivas se encontró principalmente en el complejo estriamigdalino y en la región septal. En diencefalo, se localizó en los núcleos habenulares e hipotalámicos.

De los datos presentados en este trabajo, se pudo concluir que los péptidos opioides tienen una distribución parecida en organismos representativos de diferentes grupos taxonómicos, y cuya función es similar dentro de estos grupos.

Introducción

Estudios multidisciplinarios, farmacológicos, fisiológicos e inmunohistoquímicos han sido de gran utilidad en las investigaciones de la biología comparada de los péptidos opioides, y de las posibles funciones

en las que participan a lo largo de la escala filogenética. Actualmente nuestros conocimientos sugieren que el origen de éstos, se inicia en los organismos menos evolucionados como los protozoarios, y apoyan el concepto de que son "péptidos ancestrales" con analogía entre los sistemas neurosecretores de los invertebrados y vertebrados superiores (49,50).

El descubrimiento de los receptores específicos a la morfina antecedió al descubrimiento de los opioides (40,54). Se han demostrado en invertebrados y vertebrados sitios con una alta afinidad de unión estereoespecífica con propiedades similares a las encontradas en los mamíferos. Estudios de enlace cruzado, en donde se comparan los receptores opioides de invertebrados y mamíferos sugieren que los receptores opioides han permanecido estables a través de la evolución (42,52,59). Por lo anterior, es razonable proponer que en especies más simples como las de

vertebrados no mamíferos e invertebrados, que presentan estos péptidos y sus receptores, pueden utilizarse para examinar el papel que juegan tanto en el dolor y la modulación de la información sensorial, como en otras funciones biológicas fundamentales que van desde la regulación de la ingesta de alimentos, la temperatura corporal, la fisiopatología del estrés hasta en procesos de memoria, aprendizaje y en el sistema inmunológico (38).

Hasta la fecha se han descrito más de 40 péptidos con propiedades opioides. Mediante técnicas de DNA recombinante se han identificado sus precursores. Actualmente sabemos que provienen de tres moléculas precursoras: la proopiomelanocortina o ACTH de la que se deriva la β -endorfina; la proencefalina A, de la que derivan las encefalinas; y la proencefalina B o prodinorfina de la que se derivan las dinorfinas (19,36,37), (fig. 1).

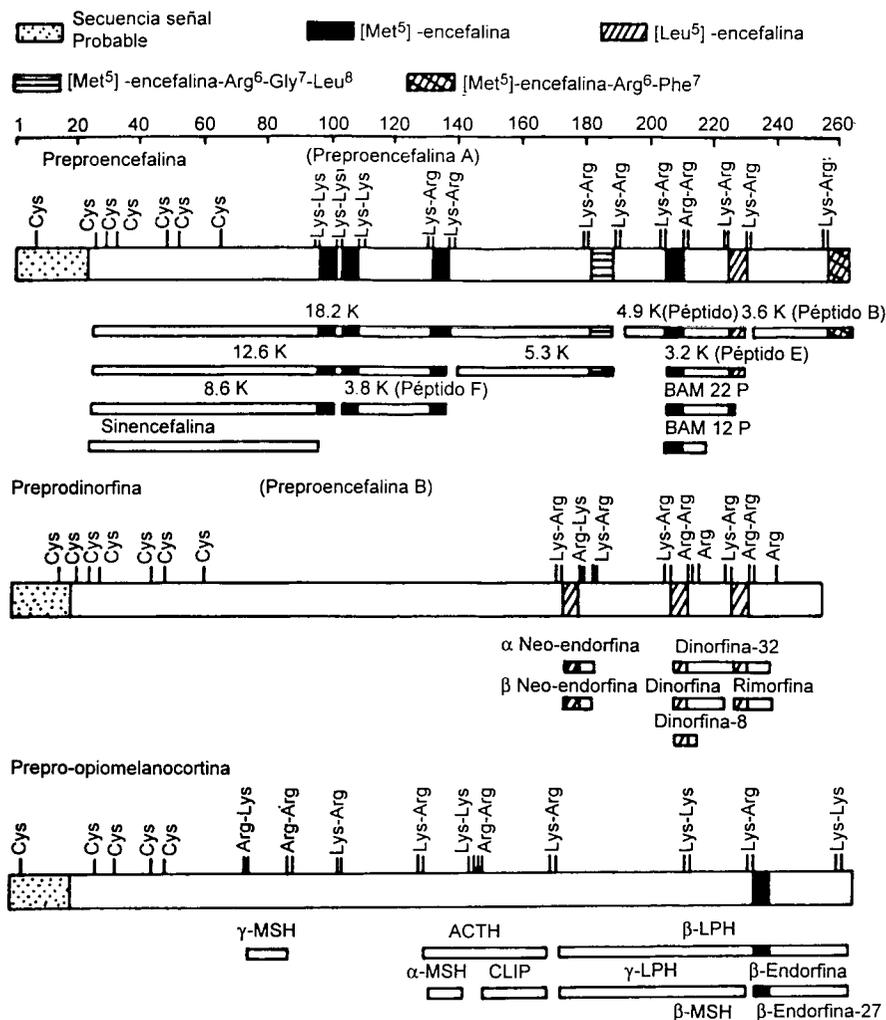


Figura 1. Representación esquemática del proceso proteolítico de las tres prohormonas que contienen péptidos opioides. Están señalados los aminoácidos básicos ya sean sencillos o en pares. Se ilustran únicamente los péptidos aislados y secuenciados en mamíferos. Esta figura es una modificación de los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

Se ha demostrado la existencia de los péptidos opioides a lo largo de la escala filogenética. En animales unicelulares como la *Tetrahymena pyriformis* se encontró la molécula precursora POMC y la β -endorfina, por medio de técnicas como el radioinmunoensayo (27). Resulta interesante este hallazgo ya que sugiere que los protozoarios contienen los genes que codifican un precursor común, similar al que codifica el precursor en los vertebrados. No se sabe qué función puedan tener estos péptidos en los protozoarios, aunque se ha visto que estas sustancias interactúan con los receptores de vertebrados. Esto sugiere la posibilidad de que estos péptidos puedan funcionar como mensajeros entre los organismos.

La POMC es el precursor común de las hormonas adrenocorticotrópicas (13) y contiene una única secuencia de la β -endorfina. Su distribución está restringida, en el cerebro de los mamíferos, al núcleo arcuato, núcleo del tracto solitario y la mayor parte de la β -endorfina en la glándula hipófisis. La β -endorfina se ha determinado también en peces cartilaginosos (30), en teleostos (20), en anfibios (12,31), en aves (3) y en mamíferos (4,47).

La proencefalina o sus derivados se han descrito en platelmintos, celenterados, anélidos, insectos, protozoarios (1,46,59), en moluscos (18,23,24,28,42.) y en peces (9,45). Es hasta los anfibios en que se tienen datos de la secuencia del gen que codifica a la proencefalina. Martens y Herbert, en 1984 (32) secuenciaron el gen que codifica a la proencefalina en el anfibio *Xenopus laevis*, y encontraron que tiene una homología con el humano del 64% aproximadamente. Existen dos diferencias en la secuencia del precursor: en el *Xenopus* la secuencia del octapéptido es ME-5-Arg-Gly-Tir, a diferencia del humano en la que es ME-5-Arg-Gly-Leu, además de que en el *Xenopus* no existe la secuencia de la LE en el gen de la proencefalina, que está reemplazada por la secuencia de la ME. Por lo tanto, en esta especie la LE está eliminada de la proencefalina. Hay evidencias en otros anfibios anuros en donde sucede lo mismo (22), por lo que se ha propuesto que la organización de la proencefalina en el *Xenopus* es representativa del grupo de los anuros, y que la LE que se encuentra en estas especies, proviene de la prodinorfina (2,26,33). En reptiles se ha demostrado también la existencia de derivados de la proencefalina (5,29,35,44.), en aves (3) y mamíferos (41).

La prodinorfina es de las tres familias de péptidos opioides la que menos se ha estudiado en la escala filogenética. Se conoce la presencia de sus derivados hasta los peces (10). En anfibios (8,26,51), como se dijo anteriormente, el gen de la proencefalina en el *Xenopus laevis* carece de la secuencia de la LE, por lo que la presencia de LE en esta especie debe de provenir de la prodinorfina. En los mamíferos, la prodinorfina contiene tres secuencias de LE (fig. 1) en la α -neoendorfina, en la DIN A (1-17) y en la DIN B (1-13), flanqueadas por aminoácidos básicos; por lo que pueden ser potencialmente liberados en el proceso proteolítico, como ocurre en la sustancia negra (57). En el *Xenopus* se ha detectado LE y α -neoendorfina por HPLC (51); sin embargo, no se ha detectado DIN

B, lo que podría significar una diferencia en el proceso proteolítico de la prodinorfina en esta especie. En los reptiles y aves se ha demostrado la existencia de DIN A (1-17), DIN A (1-8), DIN B (1-13) y α -neoendorfina (44). En mamíferos se ha estudiado extensamente la existencia y distribución de dinorfinas (7,16,21,55).

Los estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos dirigidos contra péptidos opioides han contribuido en gran manera para dilucidar su existencia y distribución anatómica en los animales de la escala filogenética. Estos estudios han sido criticados por su metodología, específicamente por el uso de anticuerpos policlonales heterólogos, desarrollados contra neuropéptidos de mamíferos, utilizados para detectar neuropéptidos en otras especies de no mamíferos. Se ha validado el uso de estos anticuerpos con base en el análisis de la secuencia de los péptidos en el que no se han encontrado diferencias fundamentales en los determinantes antigénicos del neuropéptido, es decir, que no están alterados radicalmente a lo largo de la evolución. Cuando estas pruebas inmunológicas son utilizadas con procedimientos de aislamiento bioquímico como la cromatografía líquida de alta presión, se puede afirmar con mayor seguridad, que existe el péptido (11). Sin embargo, recientemente se ha corroborado la veracidad de los estudios anatómicos con la técnica de hibridación *in situ* en que se demuestra la expresión de sus precursores en las mismas células que previamente se describieron como inmunorreactivas a péptidos opioides (17,34).

Los estudios inmunohistoquímicos que se iniciaron desde el 70, demostraron una amplia distribución de los opioides en el sistema nervioso central de vertebrados y en el sistema nervioso de los invertebrados. Se identificaron tres distintas clases de circuitos opioides: los encefalinérgicos y los dinorfinérgicos con una distribución similar, pero más amplia para los encefalinérgicos; y el circuito de la β -endorfina que es más restringido, se encuentra en menos núcleos. Se ha demostrado que una neurona sintetiza una sola clase de péptido opioide (4), pero pueden coexistir o coliberarse con otros neuropéptidos y neurotransmisores.

Nuestro grupo se ha interesado, desde 1987, en el estudio, identificación y localización de Leu-encefalina (LE), met-encefalina (ME), dinorfina 1-8 (DIN), y β -endorfina (BE), con ayuda de técnicas como la inmunofluorescencia indirecta y anticuerpos policlonales específicos para estos péptidos. Los trabajos los hemos llevado a cabo en dos especies: el caracol de jardín *Helix aspersa* del *filum* de los moluscos y el axolotl *Ambystoma mexicanum* de la clase de los anfibios. Hemos descrito la distribución anatómica de encefalinas en el ganglio nervioso periesofágico del caracol *Helix aspersa*. En esta especie encontramos IR a LE, contrariamente a lo reportado por Elekes y col. (14) en un molusco del mismo género, *Helix pomatia*. Ellos hicieron un estudio inmunohistoquímico para detectar encefalinas en el que encuentran neuronas y fibras IR a ME en los ganglios periesofágicos, pero no detectan IR a LE. En *Helix aspersa*, la distribución de LE abarca los ganglios periesofágicos del caracol. Además el tejido conectivo que rodea a los ganglios y los nervios

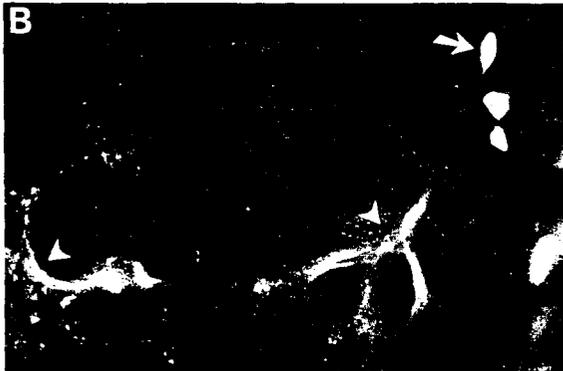
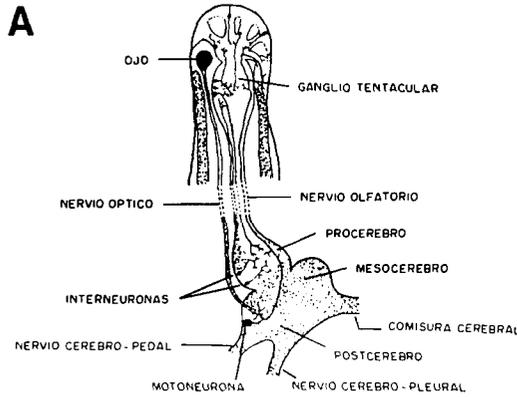


Figura 2. A. Esquema que muestra la vía sensorial del tentáculo del caracol de jardín *Helix aspersa*. B. Corte coronal de ganglio cerebroide del caracol *Helix aspersa*, donde se observan neuronas (↑) y fibras inmunorreactivas (▲) a Leu-enkefalina en el procerebro (250X). Las neuronas inmunorreactivas corresponden a las interneuronas del esquema A.

periféricos que salen de algunos de ellos presentan fibras inmunorreactivas a este péptido. Llama la atención la existencia de inmunorreactividad a LE en interneuronas pequeñas de (5-7 μm de diámetro), situadas en la parte lateral del procerebro (fig. 2A y B). Esta región pertenece a la vía sensorial del tentáculo, y es donde posiblemente se integre la información



Figura 3. Corte coronal de ganglio parietal del caracol *Helix aspersa*, donde se muestra un grupo de neuronas medianas (40-70 μm de diámetro) inmunorreactivas a Leu-enkefalina (↑) (100X).

olfativa (6,15). En mesocerebro, existen neuronas IR a LE, que corresponden a células neurosecretoras clasificadas como células verdes cerebrales fronto-dorsales (56). También algunas interneuronas medianas (40-70 μm de diámetro) de los ganglios parietales, se encuentran localizadas en la parte superior de ambos ganglios (fig. 3). Las fibras inmunorreactivas a LE son finas y están presentes en el neuropilo de todos los ganglios, y en la comisura cerebral.

La IR a ME está más ampliamente distribuida en todos los ganglios, en comparación con la IR a LE tanto en los ganglios cerebroides como en los subesofágicos. La densidad de fibras inmunorreactivas es mayor que para LE con dos tipos de fibras: gruesas y delgadas; y se encuentran en el neuropilo de los ganglios, en la comisura cerebral, en las comisuras superior e inferior que unen a los ganglios pedales, en los nervios cerebro-pedales y cerebro-pleurales, en los nervios periféricos, y en la pared aórtica. Los experimentos para determinar la distribución de las encefalinas se llevaron a cabo en cortes seriados, en donde se pudo observar que las poblaciones neuronales inmunorreactivas a LE no son las mismas que las inmunorreactivas a ME.

En estudios preliminares en colaboración con el doctor Pellicer, hemos observado que con la adminis-

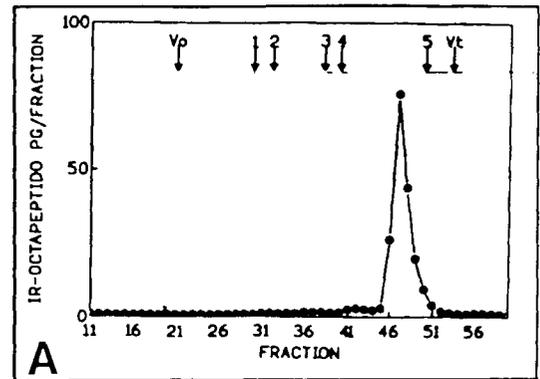


Figura 4. A. Gráfica que representa el pico de octapeptido obtenido del extracto de ganglios periesofágicos del *Helix aspersa*, mediante la técnica de HPLC-filtración en gel y RIA. El pico equivale a 6531.3 pg/g de tejido. B. Fotomicrografía de los ganglios pedales, donde se muestran fibras inmunorreactivas a octapéptido, ampliamente distribuidas en el neuropilo de estos ganglios (▲), (40X).

tración de morfina, la inmunorreactividad a encefalinas en estas células, baja de intensidad o desaparece. Esto nos habla de una regulación intrínseca en donde están implicados los receptores opioides. Además la inmunorreactividad en estas células tiene una variación estacional. Es poco intensa en primavera, muy intensa en verano y otoño, y tiende a desaparecer en invierno; lo que sugiere que las variaciones estacionales de la inmunorreactividad, de origen endógeno, pueden ser precipitadas por factores ambientales (24). Stefano y col. (53) describieron que la unión a receptor opioide y la actividad farmacológica tenían una variación estacional en un molusco marino. Gutiérrez y Asai (18) reportan el contenido de encefalinas por radioinmunoanálisis, en los ganglios periesofágicos del *Helix aspersa*, que presenta una variación estacional que concuerda con nuestros resultados. En trabajos recientes hemos demostrado por medio de inmunohistoquímica y HPLC (48) la existencia del octapéptido (met-5-Arg-Gly-Leu) en el ganglio periesofágico (fig. 4A). Este hecho sugiere que en los moluscos, el gen que codifica para la proencefalina, sí contiene esta secuencia a diferencia de los anuros que no la contienen (31). Encontramos que la inmunorreactividad al octapéptido está ampliamente distribuida en los ganglios periesofágicos. Hay un gran número de interneuronas pequeñas de

(15 μm de diámetro), en diferentes regiones de los ganglios cerebroides, así como algunas neuronas medianas (40 μm de diámetro) en estas mismas zonas. Existe una alta densidad de fibras IR en el neuropilo de los ganglios cerebroides, de los pedales (fig. 4B), pleurales y parietales. En los ganglios subesofágicos la población de neuronas IR consisten de neuronas pequeñas (~ 15 μm de diámetro) y neuronas medianas (~ 40 μm de diámetro); en la parte lateral superior de los ganglios parietales se encuentra una neurona grande (80-100 μm de diámetro, por corte). Cabe mencionar también que el pico que se encontró utilizando la técnica de HPLC (fig. 4A), se identificó como octapéptido por medio de radioinmunoensayos de las fracciones. La secuencia de este neuropéptido no se ha obtenido todavía. Estos resultados sugieren que en los moluscos hay un gen que codifica una molécula similar a la proencefalina de los vertebrados.

Demostamos también (39) la liberación de encefalinas en el ganglio periesofágico del *Helix aspersa*, en donde los mecanismos de liberación siguen el patrón clásico, es decir, la liberación es provocada por alto potasio y es dependiente de calcio. Se encontró que la relación ME:LE es 2:1, en comparación con los mamíferos que es de 6:1.

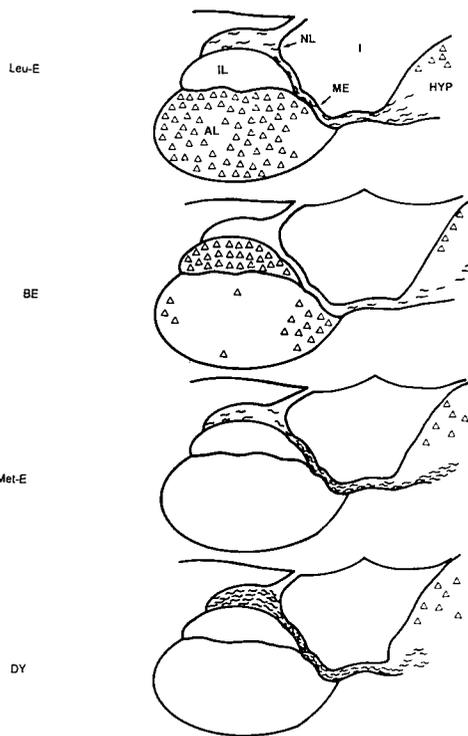


Figura 5. Representación esquemática de la distribución de L-leu-enkefalina (LE), β -endorfina (BE), Met-enkefalina (ME) y dinorfina (DIN) en la hipófisis del axolotl *A. mexicanum*. Lóbulo posterior o neural (NL), lóbulo intermedio (LI), lóbulo anterior (LA), eminencia media (EM), hipotálamo (Hip), infundíbulo (I), células inmunorreactivas (Δ), fibras inmunorreactivas (-).

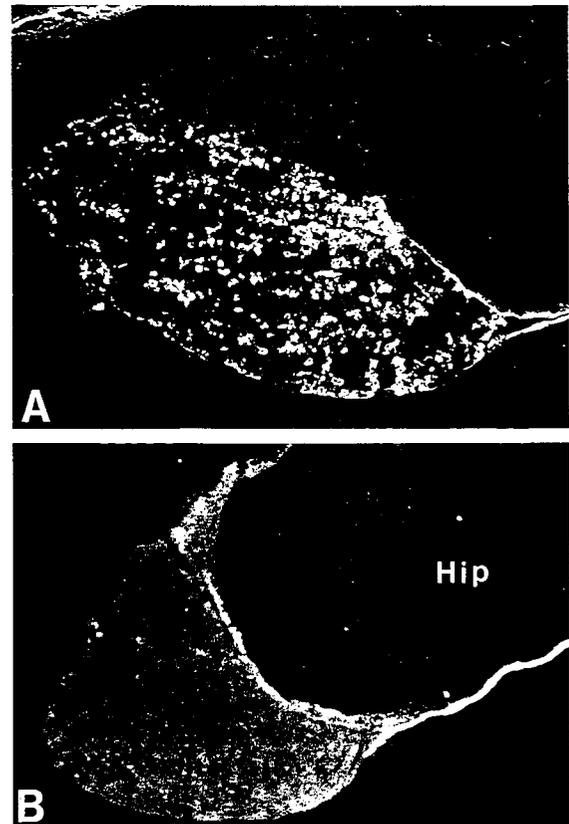


Figura 6. A. Fotomicrografía de un corte parasagital de la hipófisis de axolotl, *Ambystoma mexicanum* en etapa de adulto neoténico. Nótese la gran cantidad de células inmunorreactivas a LE en el lóbulo anterior (40X). B. Corte parasagital de la hipófisis de la salamandra, 10 días después de la metamorfosis inducida mediante la administración de tiroxina. Nótese la ausencia de inmunorreactividad a LE en las células del lóbulo anterior (40X)

En el anfibio *Ambystoma mexicanum* demostramos la existencia y la distribución de la inmunorreactividad a opioides en la glándula hipófisis, esto es, la IR a BE se encuentra en las células del lóbulo intermedio y en algunas células del lóbulo anterior. La IR a ME y DIN se encuentra únicamente en fibras de la eminencia media y en el lóbulo posterior. Hasta aquí corresponde a lo reportado para otros vertebrados y mamíferos. La IR a LE se distribuye en algunas fibras en el lóbulo posterior, en la eminencia media, y en una gran cantidad de células del lóbulo anterior. Este último dato no se había reportado en otros vertebrados, ni mamíferos (26) (fig. 5). La presencia de LE y BE en el lóbulo anterior sugieren que estos péptidos pueden actuar como hormonas liberadas por la hipófisis de este anfibio en el estado de adulto neoténico.

En experimentos posteriores hemos demostrado, que al inducir la metamorfosis mediante tiroxina, la IR a LE desaparece en el lóbulo anterior de la hipófisis de la salamandra (estado adulto del *Ambystoma*) (fig. 6A,B). Estos resultados nos sugieren más directamente que la LE juega un papel importante en el estado larvario (25).

La distribución de encefalinas en el cerebro del axolotl es similar a la encontrada en los mamíferos y otros vertebrados (cuadro 1). En telencéfalo, la concentración de fibras y neuronas inmunorreactivas a encefalinas, es principalmente en el complejo estriadoamigdalino y en la región septal (fig. 7A). El diencefalo es la estructura cerebral en donde existe una mayor concentración de neuronas y fibras inmunorreactivas a encefalinas, principalmente en los núcleos preópticos, en el epitálamo, en los núcleos habenuares, en la parte ventral del tálamo. En los núcleos hipotalámicos encontramos una alta densidad a fibras IR y neuronas inmunorreactivas distribuidas en grupos (1-6 neuronas) localizadas en toda la sustancia gris. En la región ventral hipotalámica existe un grupo de neuronas (15 aprox. por corte) cuyas terminales se dirigen hacia el infundíbulo y parecen vertir su contenido en él (fig. 7B). Algunas de ellas presentan otra prolongación hacia la parte ventral. En el mesencéfalo se encontró una ligera densidad de fibras IR en el *tectum* y en el *tegmentum*, así como neuronas IR aisladas (Fig. 7C). En los núcleos interpedunculares hay una mayor densidad de fibras y neuronas

CUADRO 1
Distribución de neuronas y fibras inmunorreactivas a LE y ME
en el sistema nervioso central del axolotl (*Ambystoma mexicanum*)

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

Notaciones: Neuronas inmunorreactivas (NIR), 0 = cero neuronas por corte, * = de 1-5, ▲ = 5-10, ■ = 10 o más neuronas.

Fibras inmunorreactivas (FIR). Densidad: escasa (+), ligera (++), densa (+++), y muy densa (++++).

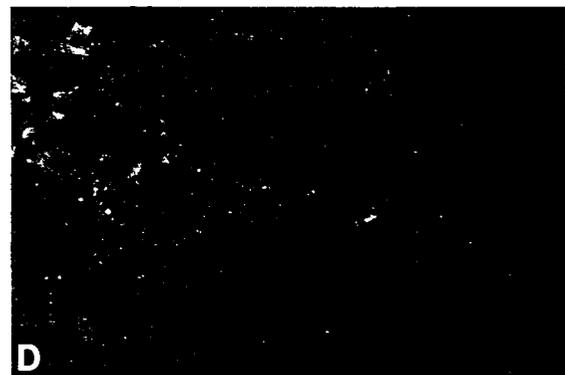
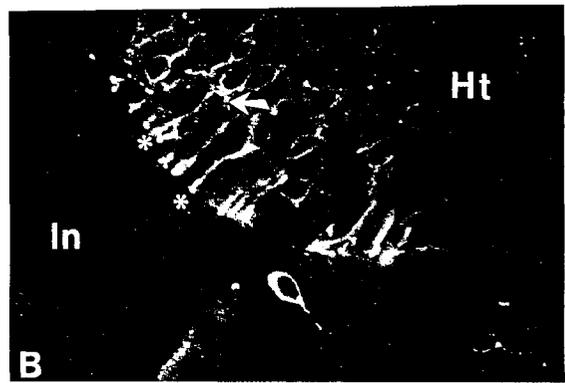
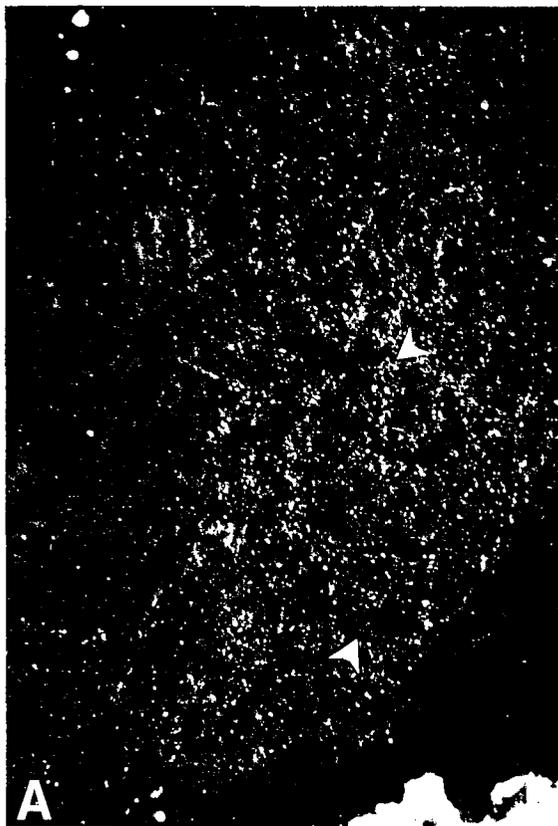


Figura 7. Fotomicrografías del cerebro del axolotl, *Ambystoma mexicanum*, que muestran neuronas y fibras inmunoreactivas (NIR y FIR) para LE y ME. A. Telencéfalo: FIR (^) a LE en la porción ventral del núcleo septal (100X). B. Diencefalo: grupo de NIR (↑) (de 10 o más neuronas) a ME localizadas en la parte dorsal del hipotálamo (Ht). Algunas neuronas dirigen sus terminales (*) hacia el infundíbulo (In) y otras hacia la parte ventral del Ht (250X). C. Mesencéfalo: NIR (↑) a LE en la capa 6 del *tectum*, con una densidad ligera de FIR (^) en las capas 4 y 5 (400X). D. Rombencéfalo: FIR y NIR a ME dentro del núcleo del fascículo solitario (400X). Todos los cortes tienen un espesor de 15 µm. Cortes coronales: A, C y D; parasagitales: B.

IR. En el rombencéfalo, la médula oblongada presenta en sus tres zonas: sensorial, formación reticular y motora fibras IR tanto para LE como para ME. En el límite de la formación reticular y en la zona motora a nivel del núcleo del VII nervio craneal existen grupos de neuronas IR a LE (1-5 por corte) y en el núcleo del fascículo solitario (fig. 7D).

Con los datos anteriores podemos concluir que los péptidos opioides tienen una distribución parecida y participan en funciones similares en organismos que representan diferentes y distantes grupos taxonómicos. La importancia de los péptidos opioides se hace evidente por la prevalencia de estas proteínas ancestrales, que prácticamente no han sufrido modificaciones a lo largo de la evolución y que son las que dan

origen a estos péptidos opioides. Estas observaciones implican que hubo un desarrollo evolutivo temprano y una continuidad filogenética de estos péptidos y sus receptores.

Agradecimientos

Al doctor Osvaldo Vindrola por su colaboración en la cuantificación del octapéptido. A Miguel Asai del Instituto Mexicano de Psiquiatría por proporcionarnos los anticuerpos anti-ME -LE y -Octapéptido, utilizados en estos estudios. Los trabajos de ilustración a Raúl Cardoso. Este estudio fue parcialmente financiado por CONACYT 1183-N9203.

REFERENCIAS

1. ALUMETS J, HAKANSON R, SUNDLER F, THORELL J: Neuronal localization of immunoreactive enkephalin and β -endorphin in the earthworm. *Nature*, (Londres), 279: 805-806, 1979.
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. BAYON A, KODA L, BATTENBERG E, AZAR R, BLOOM F: Regional distribution of endorphin, met-enkephalin and leu-enkephalin in the pigeon brain. *Neurosci Lett*, 16:75-80, 1980.
4. BLOOM FE, BATTENBERG E, ROSSIER J, LING N, GUILLEMIN R: Neurons containing β -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: Immunocytochemical studies. *Proc Natl Acad Sci*, 75: 1591-1595, 1978.
5. BRAUTH S: Enkephalin-like immunoreactivity within the telencephalon of the reptile caiman crocodilus. *Neuroscience*, 11(2):345-358, 1984.
6. CHASE R: Lessons from snail tentacles. *Chemical Senses*, 11(4):411-426, 1986.
7. CHAVKIN C, SHOEMAKER WJ, MCGINTY JF, BAYON A, BLOOM FE: Characterization of the prodynorphin and proenkephalin neuropeptides systems in rat hippocampus. *J Neurosci*, 5:808-816, 1985.
8. CONE C, GOLDSTEIN A: A dynorphin-like opioid in the central nervous system of an amphibian. *Proc Natl Acad Sci*, 79:3345-3349, 1983.
9. DORES R, FINGER T, GOLD M: Immunohistochemical localization of enkephalin and ACTH-related substances in the pituitary of the lamprey. *Cell Tissue Res*, 235:107-115, 1984.
10. DORES RM, GORSMAN A: Detection of Met-enkephalin and Leu-enkephalin in the brain of the hagfish *Eptatretus stouti* and the lamprey *Petromyzon marinus*. *Gen Comp Endocrinol*, 77:489-499, 1990.
11. DORES M, MCDONALD LK, STEVENSON TC, SEI CA: The molecular evolution of neuropeptides: Prospects for the '90s. *Brain Behav Evol*, 36:80-99, 1990.
12. DORES RM, ROTHENBERG ME: Isolation of immunoreactive β -endorphin-related peptides from the posterior pituitary of the amphibian, *Xenopus laevis*. *Peptides*, 8: 1119-1125, 1987.
13. EIPPER BA, MAINS RE: Existence of a common precursor to ACTH and endorphin in the anterior and intermediate lobes of the rat pituitary. *J Supramol Struct*, 8:247-262, 1978.
14. ELEKES K, STEFANO GB, CARPENTER DO: Enkephalin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of gastropods (*Helix pomatia*, *Lymnaea stagnalis*, *Aplysia californica*): a comparative immunocytochemical study. *Cell Tissue Res*, 272:329-341, 1993.
15. GELPERIN A, TANK DW: Odour-modulated collective network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature*, 345:437-440, 1990.
16. GOLDSMITH A, SEI CA, LANCE V, DORES RM: Detection of prodynorphin and products in lizard, turtle and alligator brain extracts. *Peptides*, 13:435-440, 1992.
17. GREENBERG MJ, PRICE DA: Invertebrate neuropeptides: Native and naturalized. *Ann Rev Physiol*, 45:271-278, 1983.
18. GUTIERREZ R, ASAI M: IR-met and IR-leu-enkephalin content in the periesophageal ganglia of *Helix aspersa* seasonal variations. *Comp Biochem Physiol*, 100 C:609-613, 1991.
19. KAKIDANI H, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, NODA H, MARIMATO Y, HIROSE T, ASAI M: Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neoenkephalin-dynorphin precursor. *Nature*, 278:423-427, 1979.
20. KAWAUCHI H, TSUBOKAWA M, KANEZAWA A, KITAGAWA K: Occurrence of two different endorphins in the salmon pituitary. *Biochem Biophys Res Commun*, 99: 871-878, 1980.
21. KHACHATURIAN H, WATSON S J, LEWIS M E, COY D, GOLDSTEIN A. Dynorphin immunocytochemistry in the rat central nervous system. *Peptides*, 3:941-954, 1982.
22. KILPATRICK D, HOWELLS R, LAHM HM, UDENFRIEND S: Evidence for a proenkephalin-like precursor in amphibian brain. *Proc Natl Acad Sci*, 80:5772-5775, 1983.
23. LEON-OLEA M, SANCHEZ-ALVAREZ M, BRIONES M, MARTINEZ-SERVIN M: Existencia de inmunorreactividad a Leu-encefalina en neuronas de caracol de jardín *Helix aspersa*. XXX Cong Soc Cien Fisiol, 1987.
24. LEON-OLEA M, SANCHEZ-ALVAREZ M, CAMACHO F: Distribution and seasonal variations of the immunoreactivity to leu- and met-enkephalins in the periesophageal ganglia of the snail *Helix aspersa*. *Soc Neurosci Abs*, 1991.
25. LEON-OLEA M, SANCHEZ-ALVAREZ M, CAMACHO F: Estudio comparativo de la distribución de la inmunorreactividad a péptidos opioides en la hipófisis de los *Ambystoma mexicanum*, *A. tigrinum*, y en la Salamandra. XXXIV Cong Soc Cien Fisiol, 1991.
26. LEON-OLEA M, SANCHEZ-ALVAREZ M, PIÑA AL, BAYON A: Evidence for enkephalin- and endorphin-immunoreactive cells in the anterior pituitary of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J Comp Neurol*, 305:412, 1991.
27. LEROITH D, LIOTTA A, ROCH J, SHILOACH J, LEWIS M, PERT C, KRIEGER D: Corticotropin and β -endorphin like materials are native to unicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci*, 79:2086-2090, 1982.
28. LEUNG M, STEFANO G: Comparative neurobiology of opioids in invertebrates with special attention to senescent alterations. *Progress in Neurobiology*, 28:131-159, 1987.
29. LINDBERG I, WHITE L: Reptilian enkephalins: implications for the evolution of proenkephalin. *Arch Biochem Biophys*, 245: 1-7, 1986.
30. LORENZ RG, TYLER AN, FAULL KF, MAKK G, BARCHAS JD, EVANS CJ: Characterization of endorphins for the pituitary of the spiny dogfish. *Squalus acanthias*. *Biochem J*, 118:713-718, 1986.
31. MARTENS C, GIVELLI O, HERBERT HE: Nucleotide sequence of cloned cDNA for proopiomelanocortin in the amphibian *Xenopus laevis*. *J Biol Chem*, 260:13685-13689, 1985.
32. MARTENS G, HERBERT E: Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. *Nature*, 310:251-254, 1984.
33. MERCHENTHALER I, MADERDRUT JL, LAZAR G, GULYAS J, PETRUSZ P: Immunocytochemical analysis of proenkephalin-derived peptides in the amphibian hypothalamus and optic tectum. *Brain Res*, 416:219-227, 1987.
34. MITCHELL V, BEAUVILLAIN J C, MAZZUCA M: Combination of immunocytochemistry and in situ hybridization in the same semi-thin sections: detection of met-enkephalin and pro-enkephalin mRNA in the hypothalamic magnocellular dorsal nucleus of the guinea pig. *J Histochem Cytochem*, 40:581-585, 1992.
35. NAIK DR, SAR M, STUMPF WE: Immunohistochemical localization of enkephalin in the central nervous system and pituitary of the lizard, *Anolis carolinensis*. *J Comp Neurol*, 198: 583-601, 1981.
36. NAKANISHI S, INOUE A, KITO T, NAKAMURA M, CHANG AC, COHEN SU, NUMA S: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature*, 278:423-427, 1979.
37. NODA M, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, TOYOSATO M, HIROSE T, INAYAMA S, NAKANISHI S, NUMA S: Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*, 295:202-206, 1982.
38. OLSON GA, OLSON RD, KASTIN AJ: Endogenous opiates 1987. *Peptides*, 13:1247-1287, 1991.
39. PELLICER F, ASAI M, LEON-OLEA M, SANCHEZ-ALVAREZ M: In vitro release of immunoreactive Met- and

- Leu-enkephalins in whole perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol*, 104C(2):323-325, 1993.
40. PERT C, SNYDER S: Opiate receptor demonstration in nervous tissue. *Science*, 179:1011-1014, 1973.
 41. PETRUSZ P, MERCHENTHALER I, MADERDRUT JL: Distribution of enkephalin-containing neurons in the central nervous system. En *Handbook of Chemical Neuroanatomy part 1*. Bjorklund A, Hokfelt T (eds), pp.273-334, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1985.
 42. PICCOLI R, MELCK D, SPAGNUOLO A., VESCIA S, ZANETTI L: Endogenous opioids in marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol*, 80:237-240, 1985.
 43. REINER A: The co-occurrence of substance P-like immunoreactivity and dynorphin-like immunoreactivity in striatonigral and striatopallidal projection neurons in pigeons and turtles. *Brain Res*, 371:155-161, 1986.
 44. REINER A: The distribution of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of turtles. *J Comp Neurol*, 259:65-91, 1987.
 45. REINER A, NORTHCUTT R G: An immunohistochemical study of the telencephalon of the African lungfish, *Protopterus annectens*. *J Comp Neurol*, 256:463-481, 1987.
 46. REMY CH, GIRARDIE J, DUBOIS MP: Vertebrate neuropeptide de-like substances in the suboesophageal ganglion of two insects: *Locusta migratoria* R, F (Orthoptera) *Bombyx mori* L (Lepidoptera). Immunocytological investigation. *Gen Comp Endocr*, 37:93-100, 1979.
 47. ROSSIER J, VARGO T M, MINICK S, LING N, BLOOM FE, GUILLEMIN R: Regional dissociation of β -endorphin and enkephalin content in rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci*, 74:5162-5165, 1977.
 48. SANCHEZ-ALVAREZ M, LEON-OLEA M, PIROS E, TALAVERA E, FAULL K F, EVANS C J: Characterization of opioid material in the perioesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Soc Neurosci Abs*, 18(1):468, 1992.
 49. SCHARRER B: Peptides in neurobiology: historical introduction. En: *Peptides in Neurobiology*. Gainer H (ed), Plenum Press, pp. 1-8, Nueva York, 1977.
 50. SCHARRER B: Peptidergic neurons: facts and trends. *Gen Comp Endocrinol*, 34:50-62, 1978.
 51. SEI CA, RICHARD R, DORES RM: Steady-state levels of pro-dynorphin-related and products from the brain of the amphibian *Xenopus laevis*. *Brain Res*, 479:162-166, 1989.
 52. SIMANTOV R, GOODMAN R, APOSHIAN D, SNYDER SH: Phylo genetic distribution of morphin-like peptide "enkephalin". *Brain Res*, 111:204-211, 1976.
 53. STEFANO GB, KREAM RM, ZUKIN RS, CATAPANE RJ: Sea sonal variations of stereospecific enkephalin binding and dopamine responsiveness in *Mytilus edulis* pedal ganglia. En: *Neurotransmitters in Invertebrates*. Rozsa KS (ed), pp. 453-459, Pergamon Press. Londres, 1981.
 54. TERENIUS L: Stereospecific interaction between narcotic analgesics and synaptic plasma membrane fraction on rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol*, 32:317-320, 1973.
 55. WATSON SJ, AKIL H, GHAZAROSSIAN VE, GOLDS-TEIN A: Dynorphin immunocytochemical localization in brain and peripheral nervous system preliminary studies. *Proc Natl Acad Sci*, 78:1 260-1263, 1981.
 56. WIJDENES J, VANMINNEN J, BOER HH: A comparative study on neurosecretion demonstrated by the alcian blue-alcian yellow technique in three terrestrial pulmonates (Stylommatophora). *Cell Tissue Res*, 210:47-56, 1980.
 57. ZAMIR N, PALKOVITS M, WEBER E, MEZEY E, BROWNSTEIN M J: A dynorphinergic pathway of Leu-enkephalin production in rat substantia nigra. *Nature*, 307: 643-645, 1984.
 58. ZIPSER B: Identification of specific leech neurons immuno reactive to enkephalin. *Nature*, 283:857-858, 1980.
 59. ZIPSER B, RUFF M, ONEILL J, SMITH C, HIGGINS W, PERT C: The opiate receptor: a single 110 K recognition molecule appears to be conserved in *Tetrahymena*, leech, and rat. *Brain Res*, 463:296-304, 1988.