



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

00322
129

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DISTRIBUCIÓN ANATÓMICA DE LA NOCICEPTINA/ORFANINA FQ EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL ANFIBIO *Ambystoma mexicanum*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
JOSÉ SAMUEL / MUCIO RAMÍREZ



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTHA LEÓN OLEA



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Distribución anatómica de la Nociceptina/Orfanina PQ en el Sistema
Nervioso Central del anfibio *Amygdaloma mexicanum*"

realizado por el pasante MUCIO MARINEZ JOSE SAMUEL

con número de cuenta 9653254-6, quién cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Martha León Olca

Martha León Olca

Propietario

M. en C. Alejandro Martínez Mena

Alejandro Martínez Mena

Propietario

M. en C. María del Pilar Torres García

María del Pilar Torres García

Suplente

Dra. Rocío Salceda Sacanellles

Rocío Salceda S.

Suplente

Dra. Luisa Alba Lois

Luisa Alba Lois

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Histología y Microscopia Electrónica de la Subdirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" a cargo de la Dra. Martha León Olea. El trabajo experimental fue apoyado parcialmente por los proyectos: IMP 3000 y CONACYT MLO 29151-N.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Nacional de Psiquiatría cuyo director es el Dr. Gerardo Heinze M. y a la Subdirección de Neurociencias a cargo del Dr. Francisco Pellicer G. por permitir realizar mi proyecto de tesis.

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a mi tutora, la Dra. Martha León Olea por su apoyo en la realización de este trabajo, por su valiosa asesoría y amistad que siempre me ha brindado.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica: Carolina Miller, Eduardo Sánchez, Feliciano Camacho y José Mendoza por su apoyo continuo.

Al jurado examinador por sus observaciones y comentarios a este trabajo.

M. en C. Alejandro Martínez Mena
M. en C. Ma. del Pilar Torres García
Dra. Rocio Salceda Sacánelles
Dra. Luisa Alba Lois

Agradezco al Dr. Benito Antón Palma del laboratorio de Neurobiología Molecular del INP por la donación del anticuerpo anti-nociceptina/orfanina FQ.

F

DEDICATORIA

Dedico especialmente esta tesis a mi querida madre Amparo Ramírez Gómez, que toda mi vida me ha apoyado, me ha acompañado, y ha sido un ejemplo para mi formación personal y profesional

A mi padre Carlos (Q.E.P.D.)

A mis hermanos: Yasmín, Carlos y Martín.

A todas mis amigas y amigos de la Facultad de Ciencias con quienes he compartido momentos de estudio y de enorme alegría.

A mis amigos y hermanos montañistas de quienes he aprendido cómo se vencen los obstáculos y se llega a la victoria.

A todos mis amigos del INP y a todos aquellos que siempre me han apoyado.

A mis queridas amigas Wendy, Verónica, Adriana, Cora, Ivette, Lizbeth y Mayvi.

Distribución anatómica de la Nociceptina/Orfanina FQ en el sistema nervioso central del anfibio *Ambystoma mexicanum*

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Capítulo I	
• Antecedentes históricos de los péptidos opioides.....	5
• Los péptidos opioides endógenos.....	6
• Terminología de opioide y opiáceo.....	7
• Biosíntesis.....	7
• Precursores y su distribución anatómica.....	9
• Los receptores opioides.....	10
• El receptor μ	10
• El receptor δ	12
• El receptor κ	12
Capítulo II	
• El receptor ORL-1 y su péptido endógeno la Nociceptina/Orfanina FQ, nuevos miembros de la familia de los opioides.....	13
• La Nociceptina/Orfanina FQ, ligando endógeno del receptor ORL-1.....	15
• El precursor de la nociceptina (PPNOC) ...	16
• Distribución anatómica de la N/OFQ.....	18
• Fisiología de la Nociceptina/Orfanina FQ.....	19
• Nocicepción.....	19
• Efecto antiopioide.....	20
• Locomoción.....	21
• Cardiovascular y Renal.....	21
• Memoria y Aprendizaje.....	22
• Actividades anti-estrés.....	22
• Termorregulación.....	22
Capítulo III	
• Los péptidos opioides en los anfibios.....	23

Capítulo IV

• El axolotl neoténico <i>Ambystoma mexicanum</i>	26
• El Sistema Nervioso Central del <i>Ambystoma mexicanum</i>	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
HIPÓTESIS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	57
ANEXOS	
1. Técnicas de tinción y gelatinización.....	58
2. Soluciones fijadoras.....	60
3. Perfusión.....	62
4. Técnicas inmunohistoquímicas.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	66

Los resultados obtenidos en el presente trabajo dieron lugar a las siguientes comunicaciones a congreso y publicaciones:

1. **S. Mucio-Ramírez**, C. Miller-Pérez, E. Sánchez-Islas, B. Antón; M. León-Olea. Anatomical distribution of Nociceptin-Orphanin FQ in the central nervous system of the *Ambystoma mexicanum*. 31Th Annual Meeting Society for Neuroscience 2001. San Diego Cal., *Neurosci. Abs.* 2174, November 10-15, 2001.
2. **Samuel Mucio-Ramírez**, Carolina Miller-Pérez, Eduardo Sánchez-Islas, Martha León-Olea. El Receptor ORL-1 y su Péptido Endógeno La Nociceptina/Orfanina FQ. Nuevos Miembros de la Familia de los Opioides. *Salud mental* vol 24 (6): 43-54 diciembre del 2001.
3. **Mucio-Ramírez S**, Miller-Pérez C, Sánchez-Islas E, Antón B, León-Olea M: Distribución anatómica de la Nociceptina/Orfanina FQ, en el Sistema Nervioso Central del *Ambystoma mexicanum*. XLV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Colima, Colima. Res. C-114, del 8 al 12 de septiembre del 2002.

Resumen

Los péptidos opioides y sus receptores se han descrito en diferentes especies de la escala filogenética. Se ha estudiado el papel que tienen en la fisiología de los organismos, evidenciando que están involucrados en la regulación de diferentes funciones biológicas. Se conocen 4 familias de péptidos opioides, que tienen una distribución amplia en el sistema nervioso central (SNC). Los principales péptidos opioides endógenos son: la β -endorfina, las encefalinas y las dinorfinas, se codifican por diferentes genes, se expresan en distintos núcleos neuronales, vías neuronales y tienen selectividades diferentes para los receptores opioides. Los miembros de la familia de los opioides que se identificaron recientemente son; el receptor ORL-1 (1994) y su agonista endógeno la Nociceptina/Orfanina FQ (N/OFQ) (1995). El ORL-1 y la N/OFQ se expresan ampliamente en el SCN. Numerosas evidencias experimentales apoyan la hipótesis de que la N/OFQ participa en la modulación de diversas funciones cerebrales como son: la nocicepción, el procesamiento motor, sensorial, cognoscitivo y neuroendocrino, así como en el aprendizaje y la memoria. Los estudios de existencia y distribución anatómica de la N/OFQ en el SNC se han hecho en rata y ratón. Nuestro grupo describió la existencia y distribución anatómica de la N/OFQ en el molusco *Helix aspersa*. Sin embargo, no existen estudios en los anfibios. La mayoría de los péptidos opioides endógenos están conservados a través de la escala filogenética, por lo que tiene relevancia buscar la existencia así como la distribución de la N/OFQ en el SNC de los anfibios. Como modelo experimental utilizamos al axolotl *Ambystoma mexicanum*. En el presente trabajo se estudió la distribución de la Nociceptina/Orfanina FQ en el SNC del axolotl. Nuestros resultados demuestran que en el cerebro de *A. mexicanum* existe inmunorreactividad (IR) a la N/OFQ y presenta una distribución anatómica amplia, similar a la reportada para la rata. Se distribuye principalmente en células y fibras de los núcleos estriamigdalino, comisura anterior, tectum, habénula, hipotálamo; eminencia media, núcleo olfatorio anterior y lóbulos intermedio y anterior de la hipófisis. La IR a N/OFQ y a la β -endorfina colocaliza en células del lóbulo intermedio de la hipófisis así como en algunas células del lóbulo anterior. La distribución anatómica de la N/OFQ sugiere que este péptido puede estar involucrado en procesos neurosecretores y hormonales, en la modulación de la información sensorial, nociceptiva o en las respuestas fisiológicas al estrés de manera similar a como se ha visto en la rata. Estos hallazgos son relevantes para el estudio de la filogenia de los péptidos opioides y para la neuroendocrinología y fisiología de los anfibios.

INTRODUCCIÓN

Capítulo I

Los péptidos opioides y sus receptores se han descrito en diferentes especies a lo largo de la escala filogenética, desde organismos unicelulares, invertebrados, protocordados y vertebrados (Kosterlitz 1980; Naik y col., 1981; Leroith y col., 1982; Kavaliers 1988; León y col., 1986, 1991; Pellicer y col., 1993; Shaw C. 1996; Olson y col., 1996; Danielson y Dores 1999; Muneoka y col., 2000). Los resultados de las investigaciones sobre el comportamiento, la fisiología y la farmacología, en todos estos organismos muestran que los péptidos opioides están involucrados en la regulación de varios aspectos de la nocicepción (ver revisiones de Moore and Black 1991; Olson y col., 1995; Bach 1997; Vaccarino y col., 1998; Calo y col., 2000). El estudio de las funciones biológicas de los péptidos opioides tiene relevancia, ya que éstos participan en la neuromodulación y también están involucrados en procesos neurosecretores y hormonales relacionados con el metabolismo y desarrollo de los organismos.

Los péptidos opioides actúan a través de 3 subtipos de receptores principalmente los denominados μ , δ , κ . Se han identificado tres familias de péptidos opioides provenientes de tres precursores la preproencefalina, la preprodinorfina y la proopiomelanocortina que dan lugar a las encefalinas, dinorfinas y a la beta-endorfina respectivamente. En la actualidad, se conocen más de 40 péptidos con propiedades opioides que se sintetizan endógenamente (Akil y col., 1997; Olson y col., 1999, Strand 1999). Los ligandos endógenos que se consideran de mayor afinidad para el receptor μ son la β -endorfina y las endomorfina 1 y 2, que son unos tripéptidos endógenos descubiertos recientemente, de los cuales no se conoce su molécula precursora (Huges 1975, Zadina y col., 1997).

Las encefalinas presentan una mayor afinidad al receptor δ (Simon y Hiller 1978; Simonds 1988; Akil y col., 1997) y las dinorfinas para el κ (Simon y Hiller 1978 Goldstein col., 1981; Mansour y col., 1995).

Antecedentes históricos de los péptidos opioides

El término opiáceo se usa para designar un grupo de drogas que son, en grado variable, semejantes por sus propiedades al opio o a la morfina. Los efectos del opio ya se conocían entre los antiguos sumerios, la primera referencia conocida se encuentra en los escritos de Teofrasto, en siglo III A.C. La palabra *opio* proviene del griego, que significa "jugo o exudado lechoso", ya que la droga se obtiene del jugo de la amapola *Papaver somniferum*. Los médicos árabes introdujeron esta droga en Oriente, donde se usó principalmente para combatir la disentería. En el siglo XVIII se hizo muy popular fumar opio en Oriente. En 1806, Friedrich Sertürner aisló y describió un alcaloide del opio que llamó morfina, por sus efectos somníferos (Morfeo: Dios griego del sueño), después del descubrimiento de este alcaloide siguió la codeína por Robiquet en 1832, luego la papaverina por Merck en 1848, así a mediados del siglo XIX, el uso de los alcaloides puros derivados del opio se difundió en el mundo médico. El opio contiene más de 20 alcaloides diferentes, entre los más importantes están la morfina, codeína, papaverina, tebaína y noscapina (Hardman, 1996).

Los experimentos más destacados para conocer el funcionamiento de los opiáceos fueron aquellos en los que se usó el ileon aislado de cobayo y se observó la inhibición de la peristalsis inducida por aumento de la presión intraluminal, al aplicar concentraciones de morfina equivalentes a una dosis terapéutica. Con este modelo en los años 70 se aportaron evidencias claras del modo de acción de los opiáceos. Tres grupos de investigadores (Terenius, 1973; Pert y Snyder 1973; Simon, Hiller y Edelman, 1978) describieron de forma independiente sitios de fijación estereoespecíficos saturables para los opiáceos en el sistema nervioso del mamífero.

Después de la demostración de sitios de unión a los opiáceos Martín y col, (1976) propusieron la existencia de 3 subtipos de receptores, uno que tenía una alta afinidad por la morfina (μ), uno para la ketociclazocina (κ) y otro para el fármaco SKF 10,047 (σ) la propuesta fue confirmada en años posteriores, primero por estudios de unión y después por la clonación de cuatro distintos receptores a opioides pero estrechamente relacionados en homología.

Los péptidos opioides endógenos

En 1975 Hughes, en experimentos realizados con homogenados de cerebro de cerdo logró purificar unas sustancias que reproducían los efectos de la morfina, como la inhibición de las contracciones evocadas eléctricamente en preparaciones biológicas del conducto deferente del ratón y del íleon del cobayo. Este efecto se revertía con antagonistas de la morfina como son la naloxona y la naltrexona. La naloxona se sintetizó en los Lab. Sankyo en 1963 y la naltrexona por Blumberg y col., en 1967 (The Merck Index 12th 1996).

El grupo de Terenius y col., (1975) determinaron la secuencia de aminoácidos de dos oligopéptidos que llamaron "encefalinas" y consiste de dos pentapéptidos similares, que difieren sólo en su carboxilo terminal, uno de ellos contiene metionina, la Met-Encefalina (Met-E) y el otro leucina, la Leu-Encefalina (Leu-E) cuya secuencia es:

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

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

Estas encefalinas provienen de la molécula precursora, proencefalina. Posteriormente en 1975, el grupo de Goldstein aisló un péptido de la hipófisis de bovino y porcino con actividad similar a la morfina y en 1976 se identificó su estructura, nombrándola beta-endorfina que corresponde al fragmento 61-91 de la β -lipotropina, la cual se genera del rompimiento enzimático de la preproopiomelanocortina (POMC; el precursor de las hormonas adrenocorticotrópicas). La β -lipotropina, a su vez, sirve como prohormona para varios fragmentos de aminoácidos moderadamente largos (Bradbury y col, 1976; Strand 1999). Las dinorfinas se derivan de un precursor, la prodinorfina o proencefalina-B, el cual muestra una considerable homología de aminoácidos con la proencefalina. Este precursor genera varios péptidos estructuralmente relacionados a la Leu-Encefalina. Además de estas tres grandes familias, existen otros agonistas con actividad opioide potente. Uno de ellos, descubierto en la piel de la rana *Phyllomedusa sauvagei* (Montecucchi y col., 1981), es un heptapéptido denominado dermorfina cuya secuencia es: His-Tyr-Ala-Phe-Glu-Tyr-Pro-Ser-NH₂, este heptapéptido es semejante a los péptidos caseomorfinicos, denominados exorfinas, extraídos de la caseína de la leche. Por otro lado la kyotorfina es un dipéptido (Tyr-Arg) que tiene actividad opioide

probablemente debido a que promueve, de manera específica, la liberación de Met-Enkefalina (Ueda y col., 1987).

Terminología de opioide y opiáceo

El término péptido opioide se utiliza, para designar a los péptidos endógenos agonistas de los receptores opioides y que presentan actividad parecida a la morfina, tanto a los de aparición natural en el sistema nervioso como a los péptidos opioides sintéticos. El término opiáceo se usa para designar a los ligandos exógenos, es decir, los derivados de la morfina e incluyen a la morfina, codeína, y una amplia variedad de derivados semisintéticos de éstos y de la tebaína (Harmand 1996).

Biosíntesis

El proceso biosintético de los péptidos opioides incluye la transcripción del gen correspondiente, la traducción en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER), la transferencia de la prohormona del RER al aparato de Golgi de donde salen y se almacenan en los gránulos secretorios previo a su liberación por exocitosis.

La síntesis de los péptidos se lleva a cabo en los ribosomas del cuerpo neuronal, como proteínas precursoras grandes que se someten a modificaciones post-traduccionales. Los procesamientos postraduccionales del propéptido ocurren durante su migración en las diferentes cisternas del aparato de Golgi en donde madura por procesos de hidrólisis, sulfatación, amidación o modificaciones oligosacáridas. La generación de un péptido biológicamente activo, a partir de su precursor, sigue de una proteólisis limitada y controlada, catalizada por peptidasas específicas que se localizan principalmente en las vesículas secretoras que reconocen secuencias de aminoácidos básicos, lisina-arginina, o una combinación de ellos (Graf y col., 1979; Chang y col., 1982; Fischli y col., 1982). Estos eventos originan a los productos bioactivos y determinan el tipo de péptido que se va a producir, dando como consecuencia su potencia, selectividad por el receptor y función (Figura 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

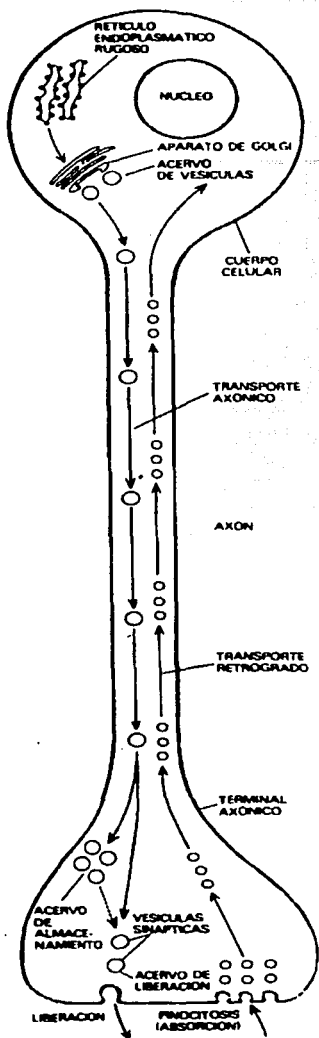


Fig. 1 Representación esquemática de la biosíntesis de los neuropéptidos. La traducción del RNAm ocurre en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER). Los precursores son llevados hacia las cisternas del RER. El empaquetamiento de los productos dentro de los gránulos de secreción (GS) ocurre en el aparato de Golgi. En los GS hay procesamientos postraduccionales que darán lugar a péptidos pequeños, esto ocurre en el cuerpo neuronal o durante el transporte axónico. Los péptidos se almacenan en los GS en las terminales nerviosas, hasta que se presenten los estímulos adecuados para su liberación (modificado de Brownstein y col., 1980).

Precusores y su distribución anatómica

1. Proopiomelanocortina (POMC).
2. Proencefalina A
3. Prodinorfina o proencefalina B.

La POMC, contiene 265 aminoácidos que presentan secuencias de varios péptidos con actividad biológica. Después de su procesamiento en el lóbulo intermedio de la hipófisis y de la hipófisis anterior, se obtiene ACTH, α -MSH y γ -MSH y β -lipotropina (β -LPH).

La β -LPH posee 91 aminoácidos pero no tiene actividad opioide, sin embargo esta secuencia contiene los residuos 61 al 91 que corresponden a un compuesto opioide potente, la β -endorfina. De la β -endorfina se genera naturalmente la γ -endorfina y la α -endorfina (Nakanishi y col., 1979; Kakidani y col., 1982; Strand 1999).

La POMC se localiza en la hipófisis, núcleos arcuato medial y basal del hipotálamo. Los péptidos derivados de la POMC se localizan principalmente en el núcleo arcuato, hipófisis, septum, núcleo acumbes, gris periacueductal, núcleo del tracto solitario, núcleo comisural y glándulas adrenales (Hardman 1999; Strand 1999; Kandel 2000).

La proencefalina-A fue descrita por el grupo de Yang en las glándulas suprarrenales, de ésta se generan las encefalinas (Yang y col., 1980). La proencefalina-A posee 267 aminoácidos y todos los productos son de naturaleza opioide. Esta proteína origina en los mamíferos, una copia de Leu-E, cuatro copias de Met-E y dos copias de la Met-E extendidas en su C-terminal, una como heptapéptido y otra como octapéptido (Comb 1982).

Las neuronas que contienen proencefalina están más ampliamente distribuidas en el cerebro que las neuronas que contienen POMC. La proencefalina-A se encuentra ampliamente distribuida en la corteza cerebral, ganglios basales, sistema límbico, diversas estructuras del telencéfalo basal como son: el núcleo acumbens, la amígdala y el piso del núcleo de la estría terminalis. También se localiza en el hipotálamo, en el tálamo, la médula espinal y la hipófisis anterior y posterior (Simanov, 1976; Noda 1982).

La prodinorfina o proencefalina B es una molécula precursora de 30 kD de la cual se derivan varios péptidos estructuralmente relacionados con la Leu-E. Ésta contiene tres secuencias de Leu-E y diversos péptidos, todos tienen la estructura de Leu-E más una extensión de aminoácidos, los péptidos generados son: α -neoendorfina, β -neoendorfina, dinorfina A (1-8), dinorfina A (1-17) y dinorfina B (1-29), (Noda y col., 1982).

La prodinorfina está ampliamente distribuida en el cerebro, de una manera similar a la proencefalina A y frecuentemente colocalizan. Entre estas estructuras están la amígdala, el hipocampo, globus pallidus y núcleo caudado. Los péptidos derivados de este precursor están presentes en áreas que se relacionan con el dolor, como son: médula espinal, núcleo espinal trigeminal y gris periacueductal (Hardman 1996; Strand 1999). (Figura 2).

Los receptores opioides

Uno de los descubrimientos más importantes de los últimos años fue la clonación y caracterización del receptor opioide δ (Evans y col. 1992; Kieffer y col., 1992). Posteriormente y mediante técnicas de DNA recombinante y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), otros grupos identificaron y caracterizaron los subtipos μ y κ (Fukuda y col., 1993; Chen y col., 1993; Minami y col., 1993; Wang y col., 1994; Uhl y col., 1994; Mansour y col., 1994,95,96), así como posibles subtipos pertenecientes a la misma familia de receptores opioides como el ϵ (Uhl y col., 1994). Los receptores opioides son proteínas membranales acopladas a proteínas G tipo inhibitoria (G_i) que inhiben la acción de la adenilato ciclasa, la entrada del calcio extracelular y estimulan la permeación extracelular de potasio (North y col., 1987).

El receptor μ

El receptor μ muestra una alta afinidad a la morfina y menor afinidad a las encefalinas y dinorfinas. En el humano está codificado por un solo gen de más de 50 Kb localizado en el cromosoma 6q25 (Wang y col., 1994). Se distribuye ampliamente en el cerebro, médula espinal, principalmente en la postsinapsis pero ocasionalmente en la

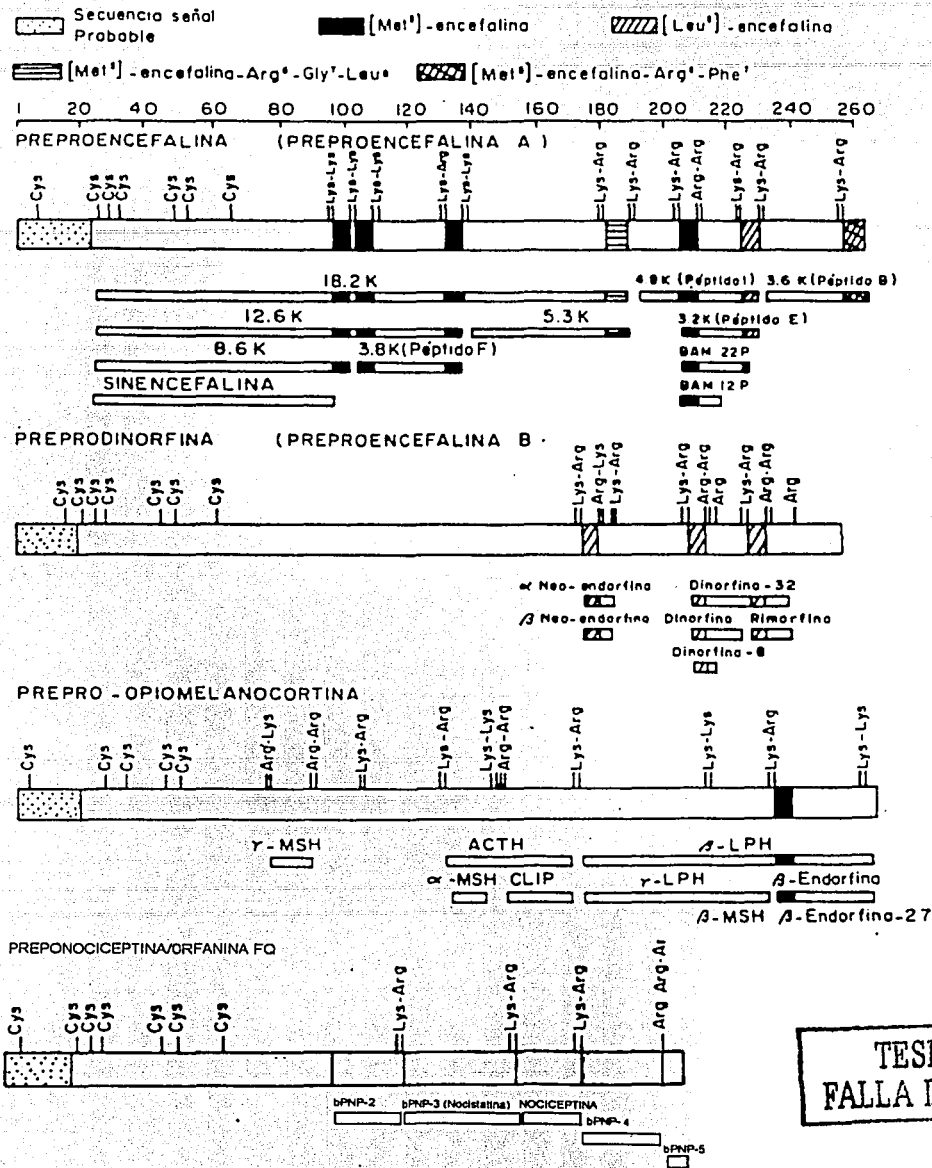


Fig. 2 Representación esquemática del proceso proteolítico de los cuatro precursores que contienen péptidos opioides. Se ilustran los péptidos aislados y secuenciados de bovino. Los pares de aminoácidos básicos son los puntos de ruptura enzimática. (Modificado de Nakanishi, 1979; Nothacker, 1996).

presinapsis (Pasternak y Wood 1986; Ding y col., 1996). En el tálamo, estriado, *locus ceruleus* y núcleo del tracto solitario se encuentran niveles altos de mRNA para el receptor μ (Mansour y col., 1994). Este receptor, está involucrado en el procesamiento de la información sensorial, se encuentra principalmente en los sitios asociados al procesamiento algésico, además la acción de sus agonistas aumentan el tono muscular, producen constipación, depresión respiratoria y dependencia física (Pasternak y Wood 1986; Strand 1999; Terenius 2000).

El receptor δ

El receptor δ tiene alta afinidad (nanomolar) para las encefalinas y una afinidad a nivel micromolar para la morfina. El receptor δ humano está codificado por un gen localizado en el cromosoma 1p34 (Evans y col., 1992). Este receptor está más limitado en su distribución a áreas sensitivas del cerebro que los receptores μ , restringiéndose al bulbo olfatorio y a la amígdala. Los receptores δ están altamente concentrados en la corteza, estriado, área lateral reticular, su distribución implica que pueden estar involucrados en la integración de la información sensitiva (Mansour y col., 1994, 1995; Akil y col., 1997).

El receptor κ

El receptor κ muestra una alta afinidad para las dinorfinas, en el humano está codificado en el cromosoma 8 y se encuentra en altas concentraciones en el núcleo accumbens, substancia nigra, área tegmental ventral, hipotálamo, lóbulos neural e intermedio de la hipófisis y el núcleo del tracto solitario (Mansour y col., 1994, 1995, 1996). Este receptor está involucrado en funciones como la nocicepción, homeostasis de fluidos, regulación hormonal y control de la respuesta visceral (Akil y col., 1997; Vaccarino y col., 1999; Strand 1999).

Capítulo II

El receptor ORL-1 y su péptido endógeno la Nociceptina/Orfanina FQ, nuevos miembros de la familia de los opioides.

Los avances en las técnicas de la biología molecular y en especial la clonación y caracterización de los receptores opioides δ , μ y κ (Kieffer y col., 1992; Evans y col., 1992; Minami y col., 1993; Fukuda y col., 1994; Uhl y col., 1994, Kieffer y col., 1997), permitieron el descubrimiento y caracterización de un nuevo receptor el ORL-1 (Opioid Receptor Like-1, por sus siglas en inglés) (Meunier y col., 1995). Se le dio este nombre por su homología estructural con los receptores opioides. Sin embargo, el receptor ORL-1 no une con alta afinidad a ninguno de los opioides clásicos ni a sus agonistas y antagonistas (Mogil y col., 1996; Rossi y col., 1996; Calo y col., 2000). Este receptor se describió por varios autores en diferentes especies animales y con distintos nombres (Tabla 1)

El ORL-1, al igual que los receptores opioides, son proteínas membranales acopladas a proteínas G de tipo inhibitorio (G_i) que inhiben a la adenilato ciclasa, la entrada de calcio a la célula y estimulan la conductancia extracelular del potasio (North 1987; Befort y col., 1994; Wang y col., 1994). El análisis comparativo de la estructura de los receptores opioides μ , δ , κ y el ORL-1 muestra que estos receptores están formados por 7 dominios peptídicos transmembranales altamente hidrofóbicos, un extremo extracelular amino terminal y un extremo citoplasmático carboxilo terminal, ambos hidrofílicos (Evans y col., 1992; Uhl 1994; Strand 1999). La homología de los dominios transmembranales entre los receptores μ , δ , κ es de entre el 60%-67% (Akil y col., 1997; Strand 1999; Dooley y Houghten, 2000), mientras que comparados con el ORL-1 es de 63-65% (Houtani y col., 1996; Meunier y col., 1997). La composición de aminoácidos en los extremos amino y carboxilo terminales es distinta en cada uno de los receptores opioides. El receptor κ es el que tiene una mayor homología con el ORL-1. Este perfil de homología sugiere que el receptor ORL-1 posee mecanismos de señalamiento intracelular similares a los empleados por los otros miembros de receptores de la familia opioide. Algunos reportes confirman esta hipótesis de acoplamiento funcional intracelular del receptor ORL-1, (Grandy 1996; Connor y col., 1996; Hawes y col., 2000; Moran y

col., 2000). El análisis de la estructura del receptor ORL-1 muestra que se encuentra altamente conservado en la rata, ratón y el humano (v.g., 95% de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos cuando se comparan las secuencias de las proteínas receptoras del humano y la rata).

El gen del ORL-1 se localiza en la región distal del cromosoma 2 del ratón (Chen y col., 1994; Nishi y col., 1994) y en el humano en la región q 13.2-13.3 del cromosoma 20 (Mollereau y col., 1994; Kieffer, 1997). La secuencia que codifica al ORL-1 en términos de la organización de intrones-exones es casi idéntica a los receptores μ , δ , κ . Esto sugiere que los cuatro genes que dan origen a estos receptores provienen de un ancestro común y por lo tanto pertenecen a una misma familia (Meunier 1997).

La distribución anatómica del receptor ORL-1 muestra que se expresa en casi todas las regiones del SNC de la rata, particularmente en las áreas corticales y cortico-límbicas (amígdala, hipocampo, habénula, septum), además de sustancia negra, hipotálamo, tallo cerebral y astas dorsales y ventrales de la médula espinal. También está presente en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (Wick y col., 1994). Estos estudios se llevaron a cabo por medio de hibridación *in situ* del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) que lo codifica (Mollereau y col., 1994; Fukuda y col., 1994; Bunzow y col., 1994; Neal y col., 1999) y por inmunohistoquímica (Antón y col., 1995). Esta distribución anatómica amplia sugiere su participación en la modulación de diversas funciones cerebrales como son: nocicepción, procesamiento motor, sensorial, cognoscitivo, neuroendocrino, así como en el aprendizaje y memoria. El ORL-1 se localiza también en el intestino, músculo esquelético, vasa deferente y bazo de rata (Wang y col., 1994) así como, en linfocitos humanos (Wick y col., 1995) esto último implica un papel en las funciones inmunológicas.

TABLA 1
Diferentes nombres del receptor de la nociceptina/orfanina FQ.

Nombre del receptor	Animal	Autor
LC132	Rata	Bunzow y col., 1994.
ROR-C	Rata	Fukuda y col., 1994.
Opr1	Rata	Chen y col., 1994.
C3	Rata	Lachowicz y col., 1994.
XOR1	Rata	Wang y col., 1994.
MOR-C	Ratón	Nishi y col., 1994.
Hyp 8-1	Humano	Wick y col., 1994.
ORL-1	Humano	Mollereau y col., 1994. Marchese y col., 1994. Keith y col., 1994.
	Cerdo	Osinsky y col., 1999.

La Nociceptina/Orfanina FQ, ligando endógeno del receptor ORL1

El ORL-1 se clasificó dentro de los receptores huérfanos (orphans) por no tener un ligando endógeno conocido. Con base en la estructura de aminoácidos de los receptores ORL-1 y κ , se esperaba que el ligando endógeno del ORL1 fuera parecido a la Dinorfina A. Dos grupos de investigación lograron identificar y aislar molecularmente, de extractos crudos de cerebro de rata (Meunier y col., 1995) y cerdo (Reinscheid y col., 1995), un péptido endógeno que se une con alta afinidad al receptor ORL-1, ($K_d \sim 0.1\text{nM}$) y es un potente agonista de este receptor ($ED_{50} \sim 1\text{ nM}$) (Butour y col., 1997). Este ligando, llamado nociceptina por el grupo de Meunier (1995) y orfanina FQ por el grupo de Reinscheid (1995), es estructuralmente idéntico en las dos especies de mamíferos. La nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) es un péptido de 17 aminoácidos (FGGFTGARKSARKLANQ) con una masa molecular de alrededor de 1800 daltones y tiene una estrecha homología con el péptido opioide dinorfina A (1-17), sin embargo no se une con alta afinidad a ninguno de los receptores opioides (Mogil y col., 1996; Rossi y col., 1996; Calo y col., 2000), (Tabla 2).

La N/OFQ y los péptidos opioides tienen una distribución anatómica similar en el SCN pero se localizan en circuitos neuronales separados (Schulz y col., 1996). La N/OFQ activa las mismas vías de señalización intracelulares que los opioides, la de las proteínas G_i que inhiben a la adenilato ciclasa, la entrada del calcio a la célula y estimulan la conductancia extracelular del potasio (North 1987; Befort y col., 1994; Wang y col., 1994^a; Yasuda y col., 1994). El resultado es como en el caso de los péptidos opioides, la reducción en la actividad neuronal. No obstante, en vivo, el perfil farmacológico de la N/OFQ difiere y en ocasiones es opuesto al de los opioides, como su efecto pronociceptivo (Meunier y col., 1995, Kavaliere y col., 1996, León-Olea y col., 2001) o la inhibición de la analgesia mediada por opioides (Mogil y col., 1996a,b; Rossi y col., 1996; Calo y col., 2000). Sin embargo, es claro que la inhibición que produce la N/OFQ a neuronas inhibitorias puede resultar en un incremento de la actividad neuronal dependiendo de los circuitos en donde actúe.

Los efectos que produce la N/OFQ dependen de la dosis y de la vía de administración, éstos pueden ser hiperalgésia, alodinia, efectos antiopioidérgicos y analgésicos. Además de presentar otros efectos como modificación de la conducta locomotora, la exploratoria, la motivación, ansiedad, memoria e ingesta de alimentos (Meunier y col., 1995; Rossi y col., 1996; Mamiya y col., 1998; Yamamoto y col., 1999). La Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR), estableció recientemente a este nuevo sistema opioide que incluye el receptor ORL1 y a su agonista, la nociceptina, como OP4 para diferenciarlo del OP1 OP2 y OP3 (para el receptor δ , κ , μ). (Calo y col., 2000).

El precursor de la nociceptina (PPNOC)

La N/OFQ se deriva de una molécula precursora muy parecida en su constitución a las de los opioides. Contiene 176 aminoácidos en el humano y bovino, 181 en la rata y 187 en el ratón. Se nombró prepronociceptina (PPNOC) y contiene una sola copia de la secuencia de aminoácidos de la N/OFQ (Meunier y col., 1995; Houtani y col., 1996; Nothacker et y col., 1996; Pan y col., 1996). El gen de la PPNOC se localiza en la región 8p21 del cromosoma 8 del humano (Mollereau y col., 1996; Houtani y col., 1996). Saito y colaboradores (1995) clonaron este mismo precursor el cual fue aislado de células de neuroblastoma y está codificado en el gen N23K.

Tabla 2

Comparación de la secuencia de aminoácidos de la nociceptina/orfanina FQ con la de los péptidos opioides

Péptido	Secuencia
Nociceptina/orfanina FQ	-F-G-G-F-T-G-A-R-K-S-A-R-K-L-A-N-Q-
Dinorfina A, 1-17	-Y-G-G-F-L-R-R-I-R-P-K-L-K-W-D-N-Q-
α -Nociceptina	-Y-G-G-F-L-R-K-Y-P-
Dinorfina B	-Y-G-G-F-L-R-R-Q-F-K-V-V-T-
β -Endorfina	-Y-G-G-F-M-T-S-E-K-S-Q-T-P-L-V-T-L-F-K-N-A-I-V-K-N-A-H-K-K-G-Q
Lcu-encefalina	-Y-G-G-F-L-
Met-encefalina	-Y-G-G-F-M-

(Los aminoácidos que comparte la N/OFQ con los péptidos opioides se muestran en negritas)

La PPNOC contiene varios sitios para el rompimiento enzimático como son los pares de aminoácidos básicos lisina y arginina, arginina y lisina, arginina y arginina (Okuda-Ashitaka y col., 1998, Darland y col., 1998, Mollerau y col., 1996, Calo y col., 2000). Para el procesamiento de la nociceptina intervienen las enzimas, aminopeptidasa N y la endopeptidasa 24.15 (Montiel y col., 1997), la secuencia de la nociceptina está flanqueada por los pares de aminoácido básicos lisina y arginina, donde actúan estas enzimas (Montiel y col., 1997 Calo y col., 2000).

En este precursor se encuentran sitios de rompimiento enzimático que dan origen a diversos péptidos bioactivos que no se unen al ORL-1 y tienen efectos diferentes a la N/OFQ. La N/OFQ, en su región carboxilo terminal está flanqueada por otro heptadecapéptido (NocII) o bidecapéptido (NocIII) que corresponde a la NocII con una extensión de tres residuos de arginina (Costentin y col., 1998) (Figura 3).

En la región amino-terminal, la N/OFQ está flanqueada por un péptido de 41 aminoácidos del cual se origina otro heptadecapéptido llamado nocistatina por el efecto antagónico sobre la hiperalgesia y alodinia inducidas por la N/OFQ. La nocistatina está conservada en humano, bovino y murino (Okuda-Ashitaka y col., 1998; Costentin y col., 1998). El gen de la PPNOC está conservado en las cuatro especies de mamíferos. El análisis de la secuencia del gen de la PPNOC revela características estructurales y de organización similar a la de la preproencefalina y preprodinorfina, lo que sugiere que estos precursores pueden derivar de un ancestro común (Mollereau y col., 1995, Nothacker y col., 1996, Danielson y Dores 1999).

Por medio del análisis de "Northern blot" se vio que el gen de la PPNOC se transcribe predominantemente en amígdala, núcleos subtalámicos, hipotálamo, sustancia negra y tálamo (Nothacker y col., 1996; Houtani y col., 1996).

	Péptido señal		
Bovino	MKILFCDLLLLLSLFSVSSVSSCQKDCLVCREKLRPTLDSFSLEMCILECEEKAFTSPLWTP		60
Humano	MKVLLCDLLLLLSLFSVSSVSSCQRDCLTCQEKLHPALDSFDLEVCILECEEKVFPSPLWTP		60
Ratón	MKILFCDVLLLLSLLSSVFSSCPDCLTCQEKLHPAPDSFNLKTCILQCEEKVFPRPLWTV		60
Rata	MKILFCDVLLLLSLLSSVFSSCPEDCLTCQERLHPAPGSFNLKLCILQCEEKVFPRPLWTL		60
		bPNP-2	
Bovino	CTKVMARGSWQLSPADPDIIVAAALDQPRASEMQIHLKRMPRVRSIFORQ-----K		109
Humano	CTKVMARSSWO LSPAPEHVAAALYQPRASEMQHLRRMPRVRSIFOEQ-----E		109
Ratón	CTKVMASGSGQLSPADPELVA ALYOP KASEMQHLKRMPRVRSLVQVRDAEPGADAEPGA		120
Rata	CTKAMASDSEQ LSPADPELT SAA LYQSKASEMQHLKRMPRVRSVVCARDAEPEA-----		114
	bPNP-3 (Nocistatina)	N/OFQ	bPNP-4
Bovino	RTEPGLEEVGE I EQKQ LQKRFGGFTGARKSARKLANQKRFFSEFMROYLVLSMQSSQRRRT		169
Humano	EPEPGMEEACEMEQQQLQKRFGGFTGARKSARKLANQKRFFSEFMROYLVLSMQSSQRRRT		169
Ratón	DAEPGADDAEEV EQKQLQKRFGGFTGARKSARKLANQKRFFSEFMROYLVLSMQSSQRRRT		180
Rata	DAEPVADEADEVE QKQLQKRFGGFTGARKSARKLANQKRFFSEFMROYLVLSMQSSQRRRT		174
	bPNP-5		
Bovino	LHQNGNA	176	
Humano	LHQNGNV	176	
Ratón	LHQNGNV	187	
Rata	LHQNGNV	181	

Fig. 3 Alineación de las secuencias de aminoácidos de la PPNOC de bovino, humano, ratón y rata. Los aminoácidos conservados en las cuatro especies están en azul, los aminoácidos de probable ruptura están en negritas y el péptido señal y los péptidos que potencialmente se liberan están indicados con líneas en la parte superior (modificado de Okuda-Ashitaka y col., 1998).

Distribución anatómica de la N/OFQ.

La N/OFQ tiene una distribución anatómica amplia en el SNC de la rata (Mitsuma y col., 1998; Neal y col., 1999). En el cerebro la inmunorreactividad (IR) N/OFQ se localiza en el sistema olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, región septal, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, puente, bulbo, pedúnculos cerebrales, complejo sensorial trigeminal, núcleos del rafe, locus ceruleus, cerebelo, médula espinal y en la retina (Riedl y col., 1996; Schulz y col., 1996; Leff y col., 1998; Mitsuma y col., 1998; Leff y col., 1999). En la médula espinal se encuentra en las astas dorsales y ventrales principalmente en

las láminas superficiales II y III, en el núcleo lateral espinal y en la lámina X (Riedl y col., 1996; Schulz y col., 1996; Leff y col., 1998; Leff y col., 1999). La IR a la N/OFQ en las astas dorsales de la médula espinal persiste después de la rizotomía dorsal, lo que indica que el péptido se origina centralmente más que en las neuronas aferentes primarias (Riedl y col., 1996). Varias de estas regiones cerebrales y de la médula espinal contienen también péptidos opioides. Sin embargo, en estudios hechos con microscopía confocal y utilizando doble marcaje no se encontró colocación de los péptidos opioides y la N/OFQ, salvo pocas excepciones como en algunas fibras y terminales nerviosas (Schulz y col., 1996). En un estudio reciente en donde se compara la localización de la N/OFQ y del RNA mensajero de la PPNOG en el SNC de la rata, éstos correlacionan en todas las áreas estudiadas (Neal y col., 1999). También se identificó en extractos de hipotálamo de mono usando técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se detectaron múltiples picos de inmunorreactividad, el pico más alto se co-eluyó con el péptido sintético N/OFQ (Quingley y cols., 1998).

Fisiología de la Nociceptina/Orfanina FQ

Los péptidos opioides actúan como neurotransmisores o neuromoduladores en varios sistemas biológicos como es el respiratorio, gastrointestinal, renal, el motor, memoria y aprendizaje, en la modulación de la información sensorial, neurosecreción, regulación hormonal y están involucrados en el crecimiento y desarrollo de los organismos. Como los opioides clásicos, la N/OFQ también participa en la modulación de estos sistemas (Brian 2000, Timothy y col., 2000). Su efecto principal a nivel celular es como modulador inhibitorio.

Nocicepción

Desde el descubrimiento del ORL-1 y su ligando endógeno la N/OFQ se predijo que podrían participar en la modulación del sistema algésico. Esta suposición era razonable ya que se fundamentaba en la homología del receptor y su ligando con los péptidos opioides y a su distribución anatómica, la N/OFQ y el ORL-1 tiene una alta densidad en los núcleos asociados con los procesos nociceptivos (Mitsuma y col., 1998; Neal y col., 1999). Los efectos de la administración de N/OFQ sobre la nocicepción son contradictorios y dependen básicamente de la dosis y vía de administración. En los

primeros estudios en donde se aplicó la N/OFQ a ratas y ratones por vía intracerebroventricular (i.c.v.) se obtuvo un incremento en la sensibilidad al dolor, de allí el nombre de nociceptina (Meunier y col., 1995; Reinscheid y col., 1995). Si la aplicación de N/OFQ es por vía intra tecal (i.t.) se produce antinocicepción (Grisel y col., 1996; Xu y col., 1996; Dawson-Basoa y col., 1997; Tian y col., 1997). Estudios subsecuentes en donde se utilizaron métodos electrofisiológicos y de comportamiento mostraron que el efecto espinal de la N/OFQ es principalmente inhibitorio y produce antinocicepción en roedores (Taylor y Dickenson, 1998; Yamamoto y col., 1999). Rossi y col., (1996) reportaron que la N/OFQ tiene un efecto hiperalgésico rápido y uno analgésico tardío, al inyectar 10 µg vía i.c.v. en ratones, y ser evaluados con la prueba de presión de la cola (tail-flick). El efecto hiperalgésico no es sensible a antagonistas opioides, pero el efecto analgésico si, por lo que ellos sugieren que la N/OFQ actúa sobre un nuevo subtipo de receptor a N/OFQ. Por otro lado, Kavaliers y Perrot-Sinal (1996) en *Cepaea nemoralis* y nuestro grupo en el caracol de jardín *Helix aspersa* (Miller-Pérez y col., 2000; León-Olea y col., 2001) reportamos que después de una inyección de N/OFQ (10 ng/20 µl) en la cavidad del hemocele, los caracoles presentan un efecto pronociceptivo al ser evaluados en la prueba de la plancha-caliente. Este efecto pronociceptivo se puede comparar con la hiperalgnesia de los mamíferos.

Efecto antiopioides

Mogil y colaboradores (1996a) demostraron que la N/OFQ revierte el efecto analgésico de la morfina al administrar por vía i.c.v una mezcla de agonistas de los receptores μ , δ , y κ más N/OFQ 10.0 nM en pruebas termonociceptivas. También la aplicación de N/OFQ i.c.v. (0.1-10.0 nM) revierte los efectos analgésicos inducidos por electroacupuntura de manera dosis-dependiente, similar a la reversión de los efectos analgésicos inducidos por morfina (Tian y col., 1997; ver revisión Darland y col., 1998). Otra de las posibles funciones moduladoras de la N/OFQ es sobre la liberación de Met-enkefalina (ME), a dosis bajas de N/OFQ (1-10 nM) inhibe la liberación y a dosis altas (100-1000 nM) produce un incremento en la liberación de ME en el plexo mientérico de cobayo (Gintzler y col., 1997).

Locomoción

Cuando la N/OFQ se administra i.c.v. (10 nM) causa una disminución en la actividad locomotora e induce ataxia y pérdida de los reflejos posturales (Reinscheid y col., 1995; Noble y Roues, 1997). Florin y colaboradores (1996), con dosis menores (5-50 pM), pudieron inhibir o estimular la actividad locomotora y la conducta exploratoria en ratones. Sandin y col., (1997), administraron N/OFQ (10 nM) directamente en hipocampo y reportaron aumento en la locomoción, particularmente en la conducta exploratoria ante estímulos nuevos. La N/OFQ modula la motilidad gastrointestinal, actúa en el sistema nervioso periférico y central estimulando o inhibiendo la actividad mecánica en el estómago y colon respectivamente (Osinski y Brown 2000). En el músculo liso de la tráquea del cuido y de la rata la N/OFQ revierte la broncoconstricción producida por la estimulación con campos eléctricos (Peiser y col., 2000).

Cardiovascular y Renal

La administración de N/OFQ produce cambios importantes en el corazón y presión arterial (Champion y col., 1997; Giuliani y col., 1997; Kapusta y col., 1997; Arndt 1999), además de cambios en las funciones excretoras renales, como diuresis y antinatriuresis (Kapusta y col., 1997). Experimentos realizados en ratas y ratones demostraron que administrar el péptido vía i.c.v. produce vasodilatación, hipotensión y bradicardia a los 30 seg post-inyección (Kapusta y col., 1999, 2000). El grupo de Kapusta (1997, 1999, 2000) reportó una marcada disminución en la frecuencia cardíaca, aumento en la presión arterial y excreción del sodio urinario así como un profundo incremento en la tasa del flujo urinario en ratas tratadas con N/OFQ. Evidencias fisiológicas sugieren que la N/OFQ modula la liberación hormonal en el eje hipotálamo-hipofisiario inhibiendo la acción de las neuronas magnocelulares en el núcleo supraóptico y presumiblemente sobre la secreción de la oxitocina y hormona antidiurética (Kakiya y col., 2000).

Memoria y aprendizaje

Los experimentos con ratones knockout para el receptor ORL-1 sugieren que la N/OFQ participa en aspectos de potenciación a largo plazo, aprendizaje y memoria modulando posiblemente al sistema dopaminérgico (Manabe y col., 1998; Nabeshima y col., 1999; Mamiya y col., 1998). La pérdida del receptor ORL1, resulta en una ganancia en los procesos de memoria y en los mecanismos de potenciación de largo plazo en el área CA1, lo que sugiere que estos procesos puedan estar modulados por la N/OFQ.

Actividades anti-estrés

La N/OFQ actúa como ansiolítico en ratas y ratones, ya que la administración i.c.v. del péptido (0.1 a 3 nm), reduce la conducta defensiva ante estímulos estresantes como son: variación de la intensidad de luz, laberintos, privación de alimento etc., (Jenck y col., 1997, 2000; Griebel y col., 1999). El grupo de Köster (1999) generó ratones knockout para la N/OFQ y observaron que en los homocigotos hay un aumento en el comportamiento de ansiedad cuando se exponen a pruebas de estrés y ambientes amenazantes. Estas evidencias sugieren que el sistema N/OFQ se activa principalmente en situaciones de alto estrés y que funciona como modulador en los procesos de la respuesta ante estímulos dañinos (Köster y col., 1999; Griebel y col., 1999).

Termorregulación

Yakimova y Pierau (1999), estudiaron los efectos de la N/OFQ (1,10 y 100 nM) sobre la sensibilidad a la temperatura en neuronas del área preóptica de rebanadas del hipotálamo anterior de la rata y en ratas íntegras. La sensibilidad a la temperatura se midió después de la administración intrahipotalámica de la N/OFQ. Dosis bajas (1nM) incrementa significativamente la sensibilidad a la temperatura de las neuronas que responden a temperaturas medias, mientras que concentraciones mayores (100 nM) disminuyen la sensibilidad a la temperatura en neuronas sensibles a temperaturas medias y en neuronas insensibles a la temperatura. Los experimentos in vivo muestran que la nociceptina (1 nM; 1 µl/rata) disminuye significativamente la temperatura corporal entre los 30 y 60 minutos después de la administración intrahipotalámica de N/OFQ.

Capítulo III

Los péptidos opioides en los anfibios

A partir del descubrimiento de los péptidos opioides en mamíferos, se han hecho estudio similares en otros animales entre ellos los anfibios. Este grupo tiene importancia en la evolución de los vertebrados, ya que los anfibios son animales que sufren modificaciones morfofisiológicas permitiéndoles cambiar de un medio acuático a un medio terrestre. En el sistema nervioso central (SNC) de los anfibios se demostró la presencia de receptores opiáceos así como sitios de unión tipo μ , δ y κ (Buatti y Pasternak 1981; Ruegg y col., 1981; Simon y col. 1984, 1985). La distribución de los péptidos opioides, principalmente las encefalinas, en el SNC de los anfibios, se han demostrado con la utilización de técnicas inmunohistoquímicas y de radioinmunoanálisis (RIA). (Buatti y Pasternak 1981; Ruegg y col., 1981; León-Olea y col., 1991; Andersen y col., 1992; Asai y col., 1998).

Vaudry y col., en 1984 y Martens y col., en 1985 reportaron la presencia de la POMC en el lóbulo neurointermedio de la hipófisis de las ranas *Xenopus leavis* y *Rana rudibunda*. Martens y col., (1985) presenta las primeras evidencias de que las proteínas precursoras de los péptidos opioides son estructuralmente homólogas a las de los mamíferos. Merchenthaler y col. (1987) por medio de inmunocitoquímica analizaron la distribución de diferentes péptidos derivados de la proencefalina en el hipotálamo y tectum óptico de diferentes especies de anfibios anuros: *Xenopus leavis*, *Rana esculenta* y *Bufo marinus*.

El grupo de Asai en 1988, con técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) demostraron el contenido de Met-encefalina y Leu-encefalina en el cerebro e hipófisis del "axolotl" *Ambystoma mexicanum* (Asai y col., 1998). Deviche y Moore (1989) caracterizaron y describieron la distribución de estos 3 tipos de receptores en la hipófisis y cerebro del anfibio urodelo *Taricha granulosa*. Nuestro grupo demostró la existencia y distribución anatómica de Leu-encefalina, β -endorfina, Met-encefalina y dinorfina A, en el cerebro e hipófisis del *A. mexicanum* con técnicas de inmunofluorescencia, (León-Olea y col., 1986; León-Olea y col., 1991; Sánchez-Islas 1993). (Tabla 3).

Zaccone y col., (1995) demostraron por inmunohistoquímica la presencia de LE en las células basales de las papilas gustativas de la lengua del *Ambystoma tigrinum*. Recientemente se clonó el cDNA de la proencefalina del cerebro de la rana *Spea multiplicatus*, éste codifica 5 copias de ME, una de octapéptido y otra del heptapéptido cuya secuencia aminoacídica es ME-RNY y ME-RF respectivamente (Lecaude y col., 2000) lo que evidencia que hay diferencias en los precursores de los péptidos en diferentes especies (Tabla 3). Por otro lado Etayo y col., (2000) reportaron inmunorreactividad a ME en las células endocrinas del páncreas de la rana *Rana temporaria*.

La N/OFQ y su receptor se han demostrado en la rata, el ratón y en el humano (Schulz 1996, Mitsuma y col., 1998; Neal y col., 1999). Son pocos los trabajos en especies animales no mamíferos en donde se demuestre la existencia de la N/OFQ y su receptor o su efecto, el único estudio realizado en anfibios es el de Benyhe en el que se demostraron sitios de unión específicos a N/OFQ en fracciones de membranas cerebrales de la *Rana esculenta* (Benyhe y col., 1999).

Tabla 3.

Comparación de los diferentes péptidos derivados de la proencefalina A en diferentes especies.

Espece	Peptidos	Referencia
Pez pulmonado <i>Protopterus annectens</i>	5 de ME 1 de ME-Arg-Ser-Leu 1 de ME-Gly-Tyr	Dores y col., 2000
Salamandra <i>Spea multiplicatum</i>	5 de ME 1 de ME-Arg-Asn-Tyr 1 de ME-Arg-Phe	Leucade y col., 2000
Rana <i>Xenopus leavis</i>	5 de ME 1 de ME-Arg-Gly-Tyr 1 de ME-Arg-Phe	Martens y Herbert, 1984
Rata	6 de ME 1 de ME-Arg-Gly-Leu 1 de ME-Arg-Phe 1 de LE 1 péptido E 1 péptido F	Merchenthaler y col., 1986
Bovino	6 de ME 1 de ME-Arg-Gly-Leu 1 de ME-Arg-Phe 1 de LE 1 péptido E 1 péptido F	Gubler y col., 1982
<i>Homo sapiens</i>	5 de ME 1 de ME-Arg-Gly-Leu 1 de ME-Arg-Phe 1 de LE 1 péptido E 1 péptido F	Kachaturian y col., 1985

Capítulo IV

El ajolote neoténico *Ambystoma mexicanum*

Los anfibios tienen vida acuática en su estado larvario, y en la vida adulta cambian sus hábitos a semiterrestres, el cambio de medio está asociado a las modificaciones morfofisiológicas del animal, permitiéndole adaptarse al ambiente terrestre (metamorfosis). El *A. mexicanum* es un anfibio neoténico, es decir, no sufre metamorfosis y llega a la madurez sexual en estado larvario (Smith 1971), se reproduce conservando su morfología de larva y mantiene esta forma a menos que se induzca la metamorfosis de manera experimental con hormonas tiroideas (tiroxina o triyodotironina) las cuales desencadenan una serie de eventos metabólicos que provocan la metamorfosis que implica la desaparición de la aleta dorsal, caudal y las branquias, aumenta la vascularización pulmonar, etc., (Coleman C, 1997). Existen diferentes especies de *Ambystoma*; entre las más conocidas están el "axolotl" obscuro endémico de los canales de Xochimilco que es el *Ambystoma mexicanum* y el *Ambystoma tigrinum*, estas especies son miembros de la gran familia de salamandras Ambystomidae que tiene 30 especies distribuidas en América del Norte desde el suroeste de Canadá, hasta el sur de México (Shaffer , 1989; Smith, 1989).

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclase: Tetrapoda

Clase: Amphibia

Orden: Urodela

Suborden: Ambystomoidea

Familia: Ambystomidae

Género: *Ambystoma*

Especie: *Ambystoma mexicanum*

El nombre vernáculo "axolotl" , del *Ambystoma mexicanum*, es de origen Náhuatl y tiene varios significados; monstruo de agua, duende de agua o perro de agua, ya que se le relaciona con el mito del Dios Azteca Xolotl, donde se supone que éste, adoptaba formas de perro, de duende, de monstruo grotesco (Smith 1989). El cuerpo del axolotl está formado por cabeza, tronco y cola, las branquias se encuentran en la parte lateral y posterior de la cabeza. (Figura. 4)



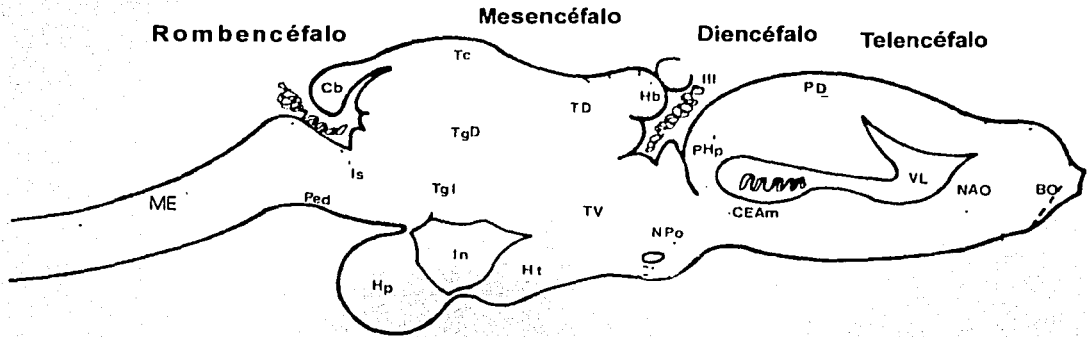
Fig. 4 Aspecto del "axolotl" neoténico adulto *Ambystoma mexicanum*

Se alimenta de peces pequeños y lombrices. En la actualidad un gran número de genetistas, biólogos del desarrollo y endocrinólogos utilizan al *Ambystoma mexicanum* como modelo animal de trabajo. Otra de las características del axolotl como animal experimental para la investigación neurobiológica es que posee estructuras cerebrales (telencéfalo, diencefalo, mesencefalo y rombencefalo) que están en los animales más evolucionados pero sin la complicación morfofuncional de los mamíferos, debido a que los urodolos, son vertebrados relativamente menos evolucionados en la escala filogenética (Armstrong 1989). Por todas estas características se considera un organismo idóneo como modelo experimental.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El Sistema Nervioso Central del *Ambystoma mexicanum*

El sistema nervioso central (SCN) del *A. mexicanum* tiene representadas las partes del SCN de los demás vertebrados como son: El telencéfalo, con sus 2 hemisferios cerebrales, diencefalo, que se divide en tálamo, hipotálamo y epitalamo, mesencéfalo, con los colículos superior e inferior y la división de tectum y tegmentum, el rombencéfalo y la médula espinal. El siguiente esquema es la representación de un corte parasagital del cerebro el *A. Mexicanum*, en el que se muestran algunas áreas del rombencéfalo, mesencéfalo, diencefalo y telencéfalo.



ME: médula espinal, Ped: pedúnculo, Is: istmo, Cb: cerebelo, Hp: hipófisis, In: infundíbulo, TgI: temgmentum istmico, TgD: tegmentum dorsal, Tc: tectum, TD: tálamo dorsal, TV: tálamo ventral, Hb: habénula, Npo: núcleo postóptico, PHp: palio hipocampal, PD: palio dorsal, CEAm: complejo estrio amigdalino, VL: ventrículo lateral, NAO: núcleo anterior olfatorio, BO: bulbo olfatorio.

Telencéfalo

En la porción anterior de hemisferios cerebrales hay un gran bulbo olfatorio y bordeando a éste se encuentra el núcleo olfatorio anterior. Las fibras olfatorias periféricas pasan por el núcleo olfatorio anterior, y posteriormente a los tractos olfatorios. El tracto olfatorio se mezcla con fibras del bulbo y del núcleo anterior, que llegan a todo el hemisferio

cerebral, habénula e hipotálamo. En las paredes de los ventrículos laterales se encuentran el complejo estrio-amigdalino en la pared ventrolateral, el septo que está ventromedialmente, y la parte palial dorsal. Existen campos paliales bien definidos como el primordio hipocámpico, el primordio piriforme dorsolateral y entre éstos el primordio palial dorsal. El septo ocupa la pared ventromedial del hemisferio entre el núcleo olfatorio anterior, la lámina terminal y el área hipocámpica, hay una ancha conexión que cruza la parte ventral del hemisferio con la amígdala y el área piriforme, la banda diagonal de Broca, y una conexión con la habénula por el tracto olfatorio habenular anterior y tracto septo habenular (Herrick 1965).

Diencefalo

Las cuatro subdivisiones primarias del diencefalo son: el epitálamo dorsal, formado por la habénula y las partes intercalares y éstas incluyen al núcleo pretecal; parte dorsal talámica; partes ventrales talámicas, y el subtálamo o zona motora del tálamo; hipotálamo. La habénula recibe fibras del telencefalo, diencefalo y del tectum. La comisura habenular conecta las 2 habénulas y las 2 comisuras de la parte palial de los hemisferios, comisura palial posterior y comisura superior telencefálica.

El tálamo dorsal se divide en, el núcleo pequeño de Bellonci, una parte medial bien definida, un núcleo sensitivo indiferenciado y un sector posterior, que contiene el primordio indiferenciado de ambos cuerpos geniculados lateral y medial. El tálamo ventral y los pedúnculos de los urodelos forman una columna de sustancia gris la cual está anatómicamente bien definida.

El hipotálamo incluye la parte ventral del tallo cerebral entre la comisura anterior y el tubérculo posterior, en su borde anterodorsal el núcleo del tracto olfato habenular, incluido en el tálamo ventral. Caudal al quiasma está el surco hipotalámico que separa al hipotálamo en su porción ventral y dorsal. Los hemisferios cerebrales están conectados con el hipotálamo por medio de fibras que pasan en ambas direcciones formando un haz en el cerebro anterior medial, el sistema estrio terminal, y el sistema del fórnix. El sector medio del tallo cerebral; diencefalo, mesencefalo e istmo regula e integra a los núcleos que participan en el sistema funcional sensorial y motor de ajuste (Herrick 1965).

Mesencéfalo

Se limita anteriormente por la comisura posterior, caudalmente por la flexión interna del istmo, el surco del istmo ventricular y ventralmente por la fovea ístmica. Estos límites son más prominentes en la larva que en el adulto. El mesencéfalo incluye el núcleo pretectal, el tectum mesencéfálico (lámina cuadrigémina) el tegmentum dorsal, el área circundante al tubérculo posterior, la flexión ventral cerebral, llamados núcleos del tubérculo posterior, los núcleos interpedunculares y los pedúnculos (Herrick 1965).

Cerebelo

En los urodelos, el cerebelo no está desarrollado como en los mamíferos, consiste de 2 partes, la primera consta del cuerpo medio al que llegan fibras procedentes de la médula espinal, nervio trigémino y tectum; así como las aurículas laterales, que están ensanchadas en la parte anterior por las terminales que provienen de la zona sensorial de la médula oblongada y la segunda situada ventralmente al cuerpo del cerebelo, un núcleo cerebelar.

Rombencéfalo

Médula oblongada, o bulbo raquídeo, se sitúa entre el istmo y el *calamus scriptorius*, no existe el puente. En su parte dorsal reúne las fibras sensoriales que vienen de la cabeza excluyendo las fibras ópticas y olfatorias, sobre el cuerpo de la médula espinal están las fibras que provienen de los núcleos de la línea lateral, y las fibras sensoriales viscerales se sitúan por el camino del vago. La unión bulbo-espinal incluye los segmentos superiores del cordón espinal y la parte inferior de la médula oblongada. Este es el primer centro de correlación que es funcional durante el desarrollo embrionario (Herrick 1965). Los segmentos del cordón espinal están organizados para la regulación de los reflejos entre ellos mismos y con la acción de la musculatura del tronco como en la locomoción ordinaria (Herrick 1965).

Los ventrículos laterales del hemisferio cerebral tiene la forma típica excepto en el foramen intraventricular, el tercer ventrículo se expande en sentido dorsal. En sentido

ventral, el alargamiento del núcleo preóptico da lugar a un receso preóptico grande entre la comisura anterior y el lomo del quiasma, enfrente de este hay un receso lateral óptico. El cuarto ventrículo es de forma típica excepto en sentido anterior, donde el receso lateral ancho con el techo membranoso se extiende hacia afuera y adelante para cubrir íntegramente la parte dorsal del lóbulo auricular (Herrick 1965).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Está bien documentado que los péptidos opioides clásicos están conservados a través de la escala filogenética. Con base en la bibliografía actual, se sabe que no existen estudios inmunohistoquímicos de la distribución anatómica de la nociceptina/orfanina FQ en ningún anfibio, únicamente en mamíferos, por ésto, y dada la importancia de la filogenia de los péptidos opioides, es relevante investigar la existencia de la nociceptina/orfanina así como describir su distribución anatómica en el SNC del *Ambystoma mexicanum*.

HIPÓTESIS

Dado que los sistemas neuropeptidérgicos se encuentran a lo largo de la escala filogenética, es posible que la Nociceptina/Orfanina FQ exista en el cerebro del *Ambystoma mexicanum* y tenga, como en los mamíferos, una distribución anatómica amplia.

MATERIALES Y METODOS

Los ajolotes se obtuvieron de nuestro ajolotario situado en el Instituto, éstos se mantienen en acuarios abiertos con una temperatura de 18 °C a 20 °C y con un ciclo artificial de luz/obscuridad 10/14 h, se alimentan con pulga de agua (*Daphnia sp*), lombrices *Tubifex tubifex* y charales pequeños vivos. Para los experimentos de este trabajo se utilizaron 15 ejemplares adultos neoténicos del anfibio *Ambystoma mexicanum*, con un promedio de 25 cm de longitud, 90 g de peso y 1.5 años de edad. Se perfundieron previa anestesia por inmersión en una solución de benzocaína al 0.2 % (ver anexo 3) por vía intracardíaca, se inyectaron 300 U.I. de heparina (Inhepar®) en el ventrículo, seguida de un lavado rápido con 150 ml de solución salina (cloruro de sodio al 0.9 %), y posteriormente 300 ml de solución fijadora. Se probaron las siguientes

soluciones fijadoras, para ver con cual de ellas se obtenían mejores resultados en la inmunohistoquímica:

- Paraformaldehído al 4 % en amortiguador de fosfato salino al 0.9 % (PBS).
- Paraformaldehído al 4% más 0.2% de ácido pícrico en PBS.
- PLP (Periodato/Lisina/Paraformaldehído, ver anexo).
- Paraformaldehído al 4% más 2% de Acroleína en PBS.

Se llevó a cabo la disección del cerebro, para lo cual se hizo una incisión en la piel por la línea media, se separaron los tejidos blandos, se removió el cartílago craneal y se extrajo el cerebro cortando los nervios craneales.

Se postfijó durante 2.5 hrs. en la misma solución fijadora y se crioprotegió en una solución de sacarosa al 30% hasta su uso posterior. Para la obtención de cortes se incluyó previamente en una sustancia para inclusión (Tissue tek de Miles®) y se realizaron cortes parasagitales y coronales de 18 µm en un criostato (Leitz mod. 1720) a una temperatura de -18 ± 2 °C.

Los cortes se recibieron en portaobjetos previamente gelatinizados y se guardaron a 4° C para su uso posterior. Se realizaron cortes seriados, cada uno de ellos se montaron en 14 diferentes portaobjetos, volviendo al portaobjetos inicial en el corte 15, de tal manera que se obtuvieron 14 series completas, de cada cerebro para posteriormente utilizarse unas como controles, experimentales y para las diferentes tinciones.

Una serie se contratiñó con safranina alcohólica.

Una se tiñó con la técnica rápida de Nissl.

Se utilizó la técnica indirecta de inmunofluorescencia de Coons con algunas modificaciones (Coons, 1958) y la inmunohistoquímica de avidina-biotina-peroxidasa (ABC, ver anexo).

Se realizaron experimentos para determinar las concentraciones óptimas de los anticuerpos para la inmunohistoquímica, en éstos se utilizaron concentraciones crecientes de los antisueros del anticuerpo C-1 (antisuero obtenido del conejo # 1) 1:500; 1:250; 1:100; 1:50; 1:20 y 1:10. Se escogió la dilución óptima de trabajo, siendo ésta de 1:10 para la inmunofluorescencia y de 1:20 para la inmunoperoxidasa.

Características del anticuerpo anti- N/OFQ

Para los experimentos inmunohistoquímicos se utilizó un antisuero policlonal contra el péptido sintético nociceptina/orfanina FQ 1-17. El antisuero anti-nociceptina fue desarrollado por el Dr. Benito Antón del Lab. de Neurobiología Molecular de este Instituto (INP). El antisuero se generó en 6 conejos Nueva Zelanda (2 kg) a los que se les inmunizó con N/OFQ 1-17 acoplada a la proteína KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin; Sigma) bajo los protocolos estándar de inmunización (Harlow y Lane, 1988). Los conejos fueron sangrados cada 2 semanas después de la más reciente inmunización, la sangre colectada se centrifugó a 3000 rpm a 4 °C y el suero se almacenó a -20 °C.

La identificación de la inmunorreactividad del antisuero a la nociceptina 1-17 sintética fue llevada a cabo usando el método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Hockfield y col., 1993). El antisuero del conejo 1 (C-1) mostró los títulos más altos (1:1 000 000) para el reconocimiento de la nociceptina 1-17 después del cuarto sangrado y se mantuvo estable hasta finalizar el programa total de inmunización. (Gutiérrez R y col., 2001).

La purificación del antisuero inmunorreactivo para la nocieptina 1-17 se realizó con el método de A-APA (por sus siglas en inglés Antigen Affinity-Purified Antisera), seguido con la purificación en una columna por afinidad al antígeno y se preparó de acuerdo con el protocolo cromatográfico estándar descrito por Harlow y Lane (1988). En el que se utilizó nociceptina sintética (Phoenix) como antígeno acoplado a la resina Sefarosa 6B epoxi-activada. Después de la inmunopurificación del anticuerpo específico, éste se verificó por el método de ELISA e inmunodot-blot (Gutierrez R y col., 2001). (Figura. 5).

Segundo anticuerpo

Como segundo anticuerpo para la inmunofluorescencia se utilizó IgG anti-conejo, desarrollado en cabra y conjugado con isotiocianato de fluoresceína (ICN™) a una dilución 1:50. Como segundo anticuerpo para la inmunoperoxidasa se utilizó IgG anti-conejo biotilnado desarrollado en burro (Jackson Immuno-Research®) a una dilución 1:500.



Fig. 5 Inmunoensayo (immunodot-blot) para determinar la sensibilidad y especificidad del anticuerpo C-1 anti-nociceptina/orfanina FQ, purificado por afinidad de antígeno a una dilución 1:100. En la parte superior están los péptidos utilizados y en la columna izquierda están las concentraciones de estos péptidos que van de 1×10^9 M a 1×10^{14} M en $1 \mu\text{l}$. F-15-Q, nociceptina/orfanina FQ; F-13-A y F-11-Q: fragmentos truncados en su región carboxilo terminal del péptido nociceptina/orfanina FQ; dinorfina 1-17, BAM-18; LE, Leu-encefalina y ME Met-encefalina. (modificada de Gutiérrez y col., 2001)

Análisis y procesamiento de imágenes

Para análisis de los experimentos de fluorescencia los tejidos se observaron en un microscopio Leitz, Laborlux 12 equipado con una lámpara de vapor de mercurio de 50 W y un bloque de filtros especiales para la banda de 490-510 nm para isotiocianato de fluoresceína y para la banda de 510-550 nm para Texas-Red y Rhodamina. Se fotografiaron las neuronas, fibras y zonas que presentaron inmunorreactividad con película para diapositivas Elite II profesional asa 400 (Kodak). Para el análisis de los experimentos de peroxidasa se observaron con el mismo microscopio utilizando iluminación de campo claro y se tomaron microfotografías en color con película EKTAR 25 profesional (Kodak).

También se tomaron fotomicrografías con una cámara digital Spot-II (Diagnostic Instruments) para su posterior edición en una computadora (Acer pentium III).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para el análisis confocal, se utilizó el microscopio confocal motorizado (Zeiss Axioskop 2) del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, las fotografías obtenidas se procesaron usando el software LSM5 Image Examiner del microscopio y posteriormente se editaron con Adobe Photoshop 7.0 y Corel Draw 8.0

Controles

Los controles para la inmunohistoquímica fueron: a) control PBS; para ver la fluorescencia nativa, b) omisión del primer anticuerpo, para ver la unión inespecífica del segundo anticuerpo, c) preadsorción del primer anticuerpo con un exceso (10^{-4} M) de su péptido sintético específico, en esta prueba se preadsorbió en un tubo eppendorff el primer anticuerpo a la dilución de trabajo (1:50) con un exceso (10^{-4} M) de su péptido sintético específico (Nociceptina/Orfanina FQ, Phoenix Pharmaceuticals Inc.) durante 24h., posteriormente se incubó esta solución durante 48 h en el tejido en lugar del primer anticuerpo

Localización anatómica de la N/OFQ

Se utilizó el atlas del cerebro del *Ambystoma tigrinum* de Herrick J, (1965), como base para la localización anatómica de las neuronas y fibras inmunorreactivas a la N/OFQ en las diferentes estructuras cerebrales, ya que existe una gran similitud anatómica de los diferentes núcleos y tractos nerviosos del *Ambystoma mexicanum* con los del *Ambystoma tigrinum*, en cuanto a forma, localización topográfica y tamaño.

RESULTADOS

En el análisis de los cortes cerebrales, tanto coronales como parasagitales se encontró una distribución amplia de la N/OFQ en el SNC del *Ambystoma mexicanum*. Algunos cerebros se fijaron bien con paraformaldehído al 4% más 0.2% de ácido pícrico sin embargo la inmunofluorescencia que se obtuvo fue muy débil. El paraformaldehído más acroleína y el PLP permitieron una buena fijación, sin embargo, los sitios antigénicos se perdieron con esta fijación que es un poco más agresiva que los anteriores ya que la marca obtenida usando las dos técnicas fue débil y escasa, por lo que no es recomendable estos dos fijadores para el cerebro del ajolote. La mejor fijación de los cerebros fue con el paraformaldehído al 4 % en PBS (anexo 2) y una postfijación de 3 h. con el mismo fijador, esta fijación mantuvo muy bien los sitios antigénicos lo cual permitió realizar las dos técnicas inmunohistoquímicas. Los resultados que se reportan en este trabajo son con éste último fijador.

Distribución regional de la IR a Nociceptina/Orfanina FQ en el cerebro del *Ambystoma mexicanum*.

La identificación de las neuronas y fibras inmunorreactivas (NIR y FIR) se hizo en cortes coronales y parasagitales de 18-20 μm de espesor. La densidad de neurona y fibras inmunorreactivas se representa como sigue: densidad escasa (+), media (++) , alta (+++) dependiendo de la cantidad de fibras con IR en cada región cerebral (fig 6), en el caso de las neuronas inmunorreactivas, los símbolos \blacktriangle = de 5-10 neuronas, \blacksquare = más de 10 neuronas (Fig. 6, 7). Las FIR, en su mayoría fueron finas y vesiculadas, sólo en pocos núcleos se observaron fibras gruesas y no vesiculadas como fue en la comisura anterior. Las neuronas inmunorreactivas a N/OFQ midieron entre 10 y 15 μm de diámetro. La IR se distribuyó homogéneamente en el citoplasma del cuerpo neuronal y no hubo IR en el núcleo. Las áreas cerebrales que presentaron intensa inmunorreactividad, tanto en fibras como en cuerpos neuronales fueron: el núcleo anterior del bulbo olfatorio, complejo estrió-amigdalino, comisura anterior, comisura habenular, comisura hipocampal, lóbulo intermedio de la hipófisis, eminencia media, tectum, parte dorsal hipotalámica, pedúnculo, tálamo dorsal y médula. Las áreas que presentaron moderada inmunorreactividad fueron: médula oblongada, núcleos preópticos, cerebelo, neurópilo

de la amígdala, eminencia talámica, habénula, septum y primordio hipocampal. Algunas fibras y neuronas inmunorreactivas del complejo estriamigdalino rodeaban vasos capilares.

Telencéfalo

En el telencéfalo se encontró una amplia distribución de FIR y NIR con diferentes densidades. En el núcleo olfatorio anterior (NOA) se encontró una alta densidad de FIR (+++) así como en el nervio olfatorio (Fig. 26 y 27). En la región glomerular se encuentran grupos de 5 NIR de aprox. 15 μm de diámetro. En el área palial dorsal (PD) existe una densidad alta de FIR (+++) para N/OFO y grupos de más de 10 NIR (Fig. 19) así como en el palio piriforme (PP) en el que las FIR fueron finas y con pocas o ninguna vesiculación, también en esta área se encontraron algunos grupos de 10-15 NIR. En los núcleos septales se encontraron pocos grupos de 5 NIR (\blacktriangle) y una densidad media de FIR (++). La parte ventrocaudal del complejo estriamigdalino (CEAm) es uno de los núcleos con más alta densidad de FIR (+++) en el que se observaron fibras finas, largas y vesiculadas, muchas de ellas cerca de los vasos capilares, en la amígdala se observaron escasas neuronas aisladas de 15 μm con intensa inmunorreactividad (Fig. 20, 21 y 22). La comisura anterior presentó también una densidad alta de FIR (Fig. 15). El núcleo caudado (NC) y comisura palial (CP) presentaron una densidad media (++) de FIR. En el CEA, NC, CP y área preóptica (AP) se observaron pocas NIR cuyo diámetro promedio fue de 13 μm .

Diencéfalo

En el diencéfalo es donde se encontró la mayor densidad de NIR y FIR a N/OFO. La zona talámica dorsal, media y ventral (TD, TM y TV respectivamente) presentaron escasa NIR y una alta densidad de FIR (+++), en particular en el TV, en el que las FIR fueron vesiculadas. En el quiasma óptico y los núcleos preópticos se presentó alta densidad de FIR (+++). El hipotálamo (Ht), eminencia media y los núcleos infundibulares fueron las zonas diencefálicas con una densidad alta de FIR (+++) y NIR (Fig. 16, 17 y 18). En estos núcleos cerebrales se presentaron grupos de 20-30 NIR de 13 μm en promedio, las cuales tuvieron una marca citoplásmica homogénea, sólo algunas neuronas monopolares presentaron una tinción heterogénea en las que se observaron

granulaciones o zonas citoplásmicas más marcadas que otras. En la periferia de los vasos capilares se observaron algunas FIR vesiculadas.

Mesencéfalo

En el tectum óptico, tegmentum e istmo se observaron una distribución dispersa de algunos grupos de 4 a 5 NIR (▲) y se pudo observar una densidad media de FIR (++) . Las NIR fueron pequeñas de aprox. 12 μm y las fibras no presentaron vesiculaciones claras.

Cerebelo

En cuanto al cerebelo la densidad de FIR fue escasa (+) en general. En los núcleos cerebelosos se presentaron grupos de más de 10 NIR, que fueron células monopolares pequeñas de 10-12 μm .

Rombencéfalo

Tanto en los cortes coronales como en los parasagitales se observó en la médula una densidad alta de FIR (+++) y algunas neuronas IR aisladas, a nivel del puente se observó el neuropilo con intensa IR (Fig. 8-14).

Hipófisis y eminencia media

El lóbulo intermedio de la glándula hipófisis (LI) comparado con otras áreas cerebrales presentó la mayor cantidad de células inmunorreactivas a la N/OFQ. Se observó una distribución de células positivas en casi todo el lóbulo intermedio tanto en los experimentos de inmunoperoxidasa como en los de inmunofluorescencia (Fig. 28, 30 y 32). La fluorescencia en las células del LI fue intensa y homogénea. En el lóbulo anterior hipofisiario (LA) se observaron algunas células IR aisladas con granulaciones citoplásmicas (Fig. 32). Para comprobar si existía colocalización o coexistencia en estas células, se realizaron experimentos de doble marcaje y se analizaron con un microscopio confocal (Zeiss Axioskop 2). Los resultados muestran que la N/OFQ y la β -endorfina coexisten en las células del lóbulo intermedio así como en algunas células del lóbulo anterior, también se usó un anticuerpo anti-Leu-Encefalina y se encontró una ligera colocalización en las mismas zonas (Fig. 35 y 36). En el lóbulo neural no se observó IR a

fibras o neuronas. En la eminencia media se observó que la mayoría de las FIR presentaron vesiculaciones (similar a como se presentó en el hipotálamo y el complejo estriomigdalino), y algunas fueron un poco más gruesas (Fig. 34 y 36).

Resultados de los controles:

Los tejidos control en los que no se incubó con el primer anticuerpo no presentaron inmunorreactividad. Ciertas células y tejidos presentan fluorescencia inespecífica en otro color que se puede diferenciar de la específica de isotiocianato de fluoresceína (FITC), que es verde brillante. En el caso de la inmunoperoxidasa, al inhibirse la peroxidasa endógena y el bloqueo de sitios inespecíficos queda únicamente la tinción específica. En la preadsorción (primer anticuerpo 1:50, péptido sintético Nociceptina/Orfanina FQ, 10^{-4} M, Phoenix Pharmaceuticals Inc.) en ninguno de los experimentos tanto inmunoperoxidasa como la inmunofluorescencia hubo IR a neuronas o fibras. Con estos resultados la inmunorreactividad al anticuerpo se consideró específica para la N/O/FQ (Fig. 31).

En la Fig. 6 se muestra la distribución de FIR y NIR a la N/O/FQ es un esquema representativo de un corte parasagital. En la Fig. 7 se muestra la distribución anatómica de las NIR y la densidad de FIR en esquemas de cortes coronales seriados del *Ambystoma mexicanum*. En la Tabla 4 se hace un resumen del número de neuronas IR y la densidad de FIR por región.

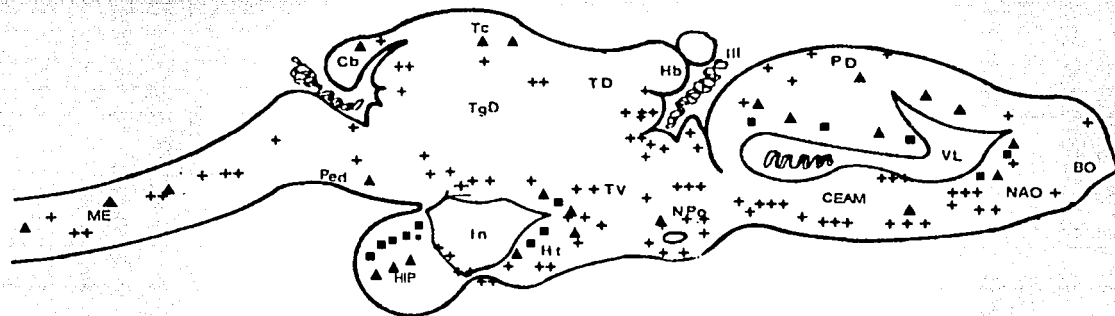


Fig. 6. Representación esquemática de un corte parasagital del cerebro del *Ambystoma mexicanum*. Se muestra la distribución de neuronas y la densidad de fibras inmunoreactivas a la N/O/FQ. Neuronas inmunoreactivas (NIR) ▲ = de 5-10 neuronas, ■ = más de 10 neuronas.

Tabla 4.

Distribución de neuronas y fibras inmunorreactivas a la Nociceptina/Orfanina FQ en el cerebro del *Ambystoma mexicanum*.

Estructuras	NIR	FIR
TELENCEFALO		
Núcleo Olfatorio Anterior	▲	++
Palio dorsal	■	++
Palio piriforme	▲	+++
Palio hipocampal	■	+
Núcleos septales	■	+++
Cuerpo estriado	▲	+++
Núcleo amigdalino	■	+++
Núcleo caudado	-	++
Comisura anterior	-	+++
Núcleo preóptico	■	+++
Comisura palial	▲	+++
DIENCEFALO		
Tálamo dorsal	▲	+++
Tálamo medial	-	++
Tálamo ventral	▲	+++
Núcleos habenulares	▲	++
Comisura hipocampal	▲	+
Hipotálamo	■	+++
Eminencia media	-	+++
HIPOFISIS		
Hipófisis lóbulo anterior	■	-
Hipófisis lóbulo intermedio	■	-
MESENCEFALO		
Téctum óptico	▲	++
Tegmentum	▲	++
Istmo	▲	+++
Cerebelo		
Médula espinal	▲	+++

Neuronas inmunorreactivas (NIR) ▲ = de 5-10 neuronas, ■ = más de 10 neuronas.
Fibras inmunorreactivas (FIR), densidad escasa (+), media (++), alta (+++)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

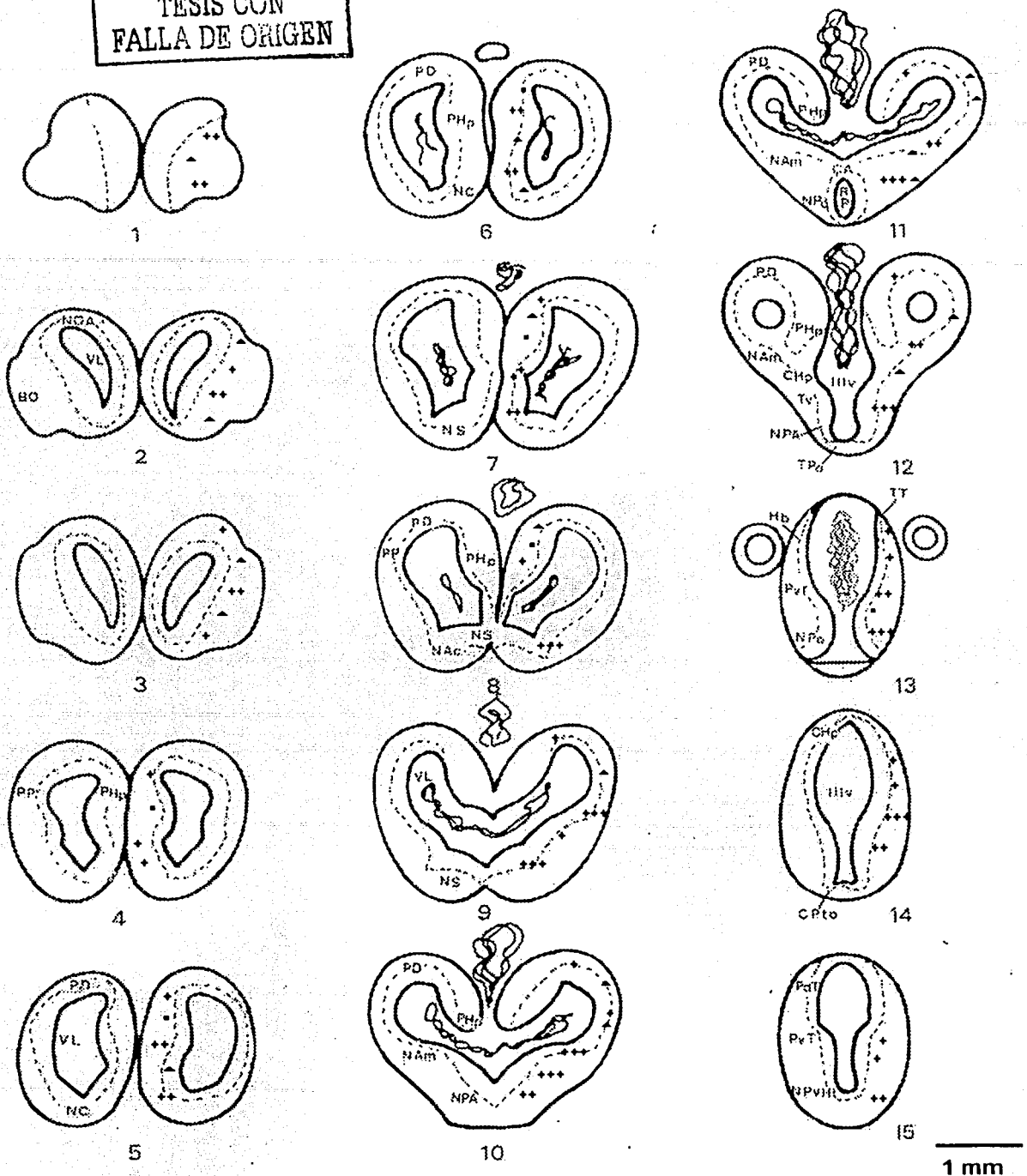
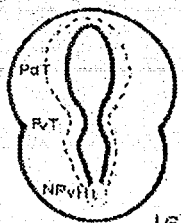
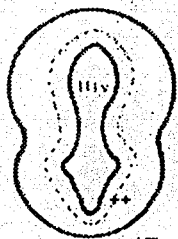


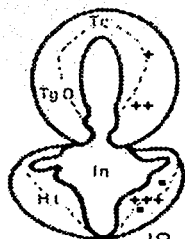
Fig. 7 Esquemas de cortes coronales del cerebro del axolotl, donde se muestra la distribución anatómica de fibras y neuronas inmunoreactivas a la N/O/FQ.



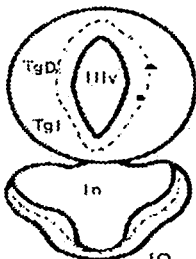
16



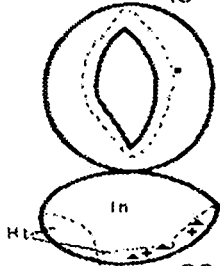
17



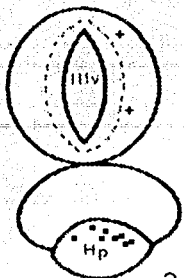
18



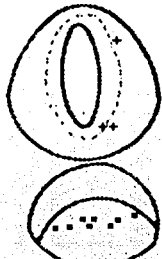
19



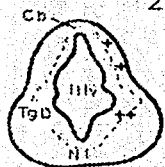
20



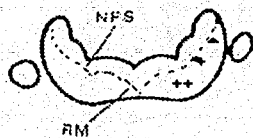
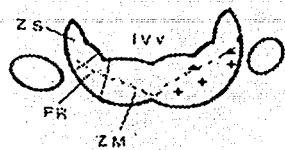
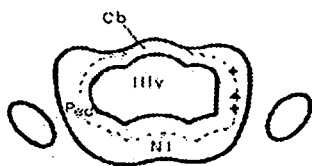
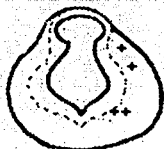
21



22



23



1 mm

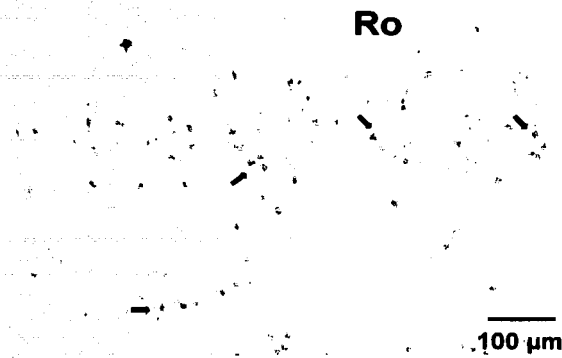


Fig. 8 Corte parasagital del rombencéfalo (Ro) a nivel de la médula espinal del *Ambystoma mexicanum*. Se observan neuronas inmunorreactivas (NIR) a la N/OFQ (→).

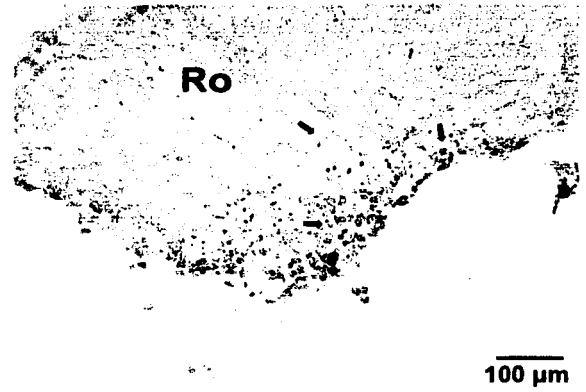


Fig. 9 Corte coronal del rombencéfalo (Ro) a nivel de la médula espinal del *Ambystoma mexicanum*. Se observan neuronas y fibras inmunorreactivas (NIR y FIR) a la N/OFQ (→) en la parte más ventral del corte.

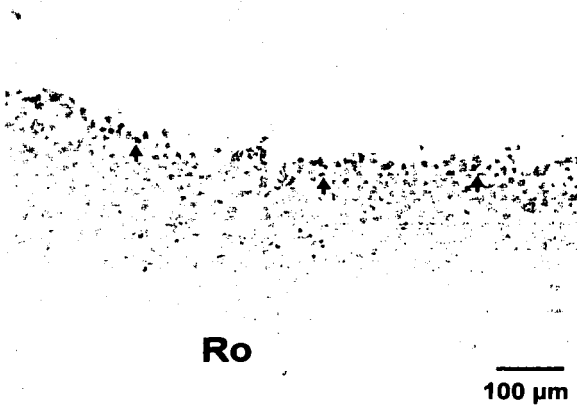


Fig. 10 Corte parasagital del cerebro del *A. mexicanum* de rombencéfalo (Ro) a nivel del funículo dorsal. Se observan neuronas inmunorreactivas (NIR) a la N/OFQ (→).

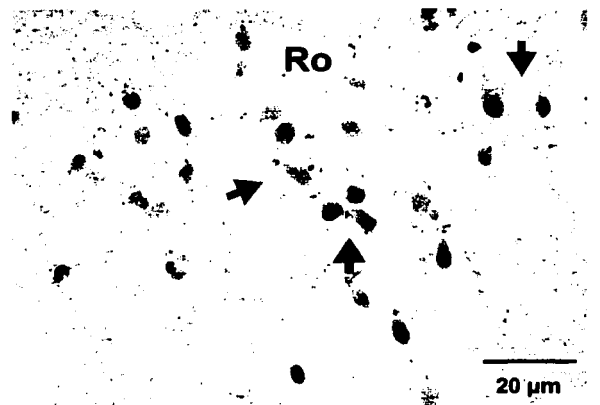


Fig. 11 Aumento del corte anterior del cerebro de *A. mexicanum* a nivel del funículo dorsal. Se observan neuronas inmunorreactivas (NIR) a la N/OFQ (→), Ro: rombencéfalo.

Nota: el recuadro en la imagen del cerebro es la ubicación más próxima de las partes



Fig. 12 Corte parasagital del cerebro de *A. mexicanum* del rombencéfalo (Ro) a nivel del calamus scriptorius. Algunas neuronas (†) y fibras (▲) muestran IR a la N/OFQ.

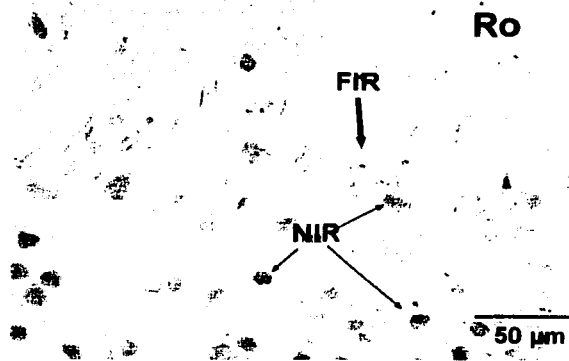


Fig. 13 Aumento del corte anterior del cerebro de *A. mexicanum* del rombencéfalo (Ro). Se observan neuronas aisladas y fibras inmunorreactivas a la N/OFQ.

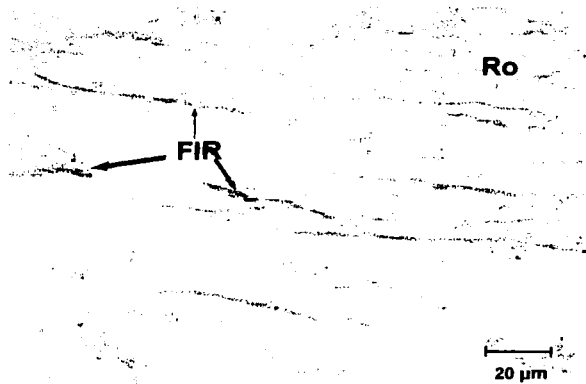


Fig. 14 Corte parasagital del cerebro del *A. mexicanum* del rombencéfalo (Ro) a nivel del tracto espino-cerebeloso. Se observan fibras inmunorreactivas (FIR) a la N/OFQ-IR en el neuropilo ventral.

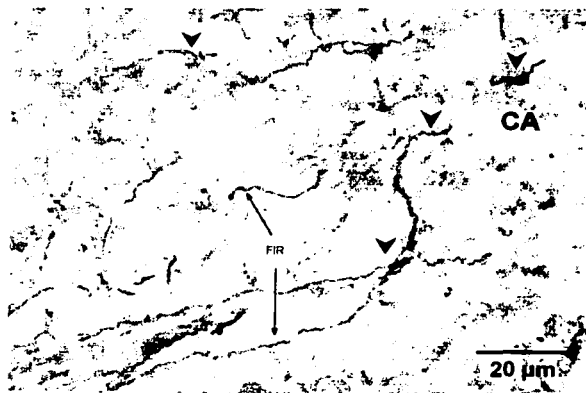


Fig. 15 Corte parasagital del cerebro del *A. mexicanum* a nivel de la comisura anterior (CA). Nótese la densidad de fibras vesiculadas inmunorreactivas a la N/OFQ (▼).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

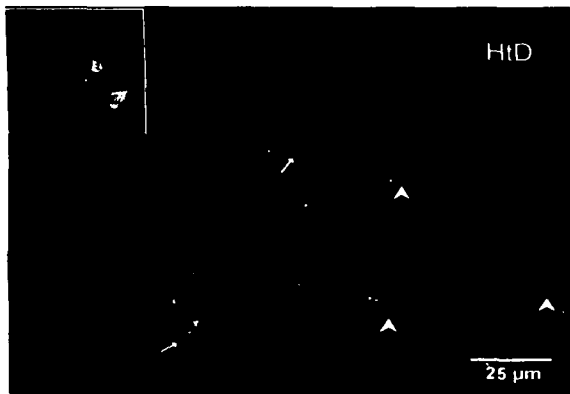


Fig. 16 Inmunofluorescencia para la N/OFQ en el hipotálamo dorsal (**HtD**) del cerebro del axolotl. Se observan fibras (**▲**) y neuronas inmunorreactivas (**†**).



Fig. 17 Corte parasagital del hipotálamo (**Ht**) del cerebro del axolotl. Se observa la inmunorreactividad a la N/OFQ en varias neuronas hipotalámicas (**†**).



Fig. 18 Localización de la inmunorreactividad a la N/OFQ en el hipotálamo dorsal (**HtD**) del cerebro del axolotl. Algunas neuronas (**†**) y fibras (**▲**) muestran IR a la N/OFQ.



Fig. 19 Corte parasagital de telencéfalo donde se muestra la localización de la inmunorreactividad a la N/OFQ en el palio dorsal (**Pd**). Neuronas (**†**) y fibras IR (**▼**).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

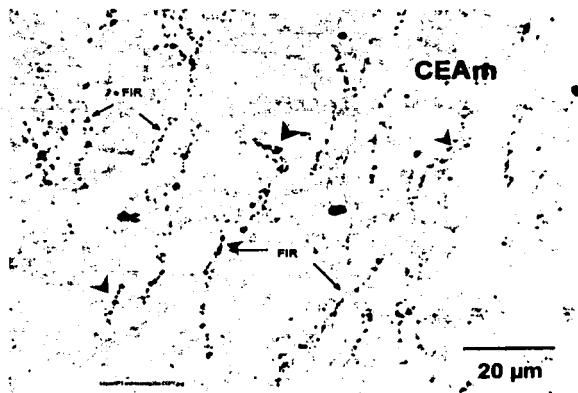


Fig. 20 Corte parasagital del complejo estri-
amigdalino (CEAm). Nótese la densidad de
fibras vesiculadas inmunorreactivas a la
N/OFQ (▼).

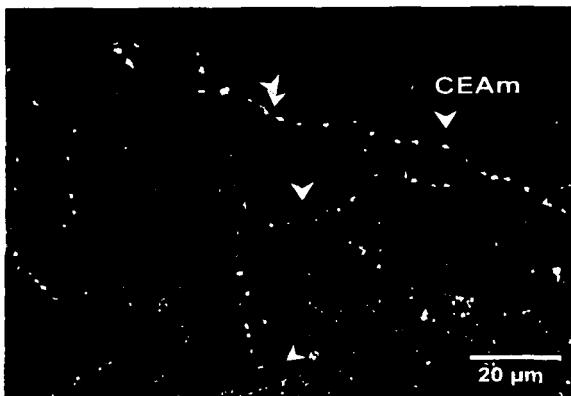


Fig. 21 Corte parasagital del complejo estri-
amigdalino (CEAm). Inmunofluorescencia
para la N/OFQ. Nótese la densidad de fibras
vesiculadas inmunorreactivas (▼).

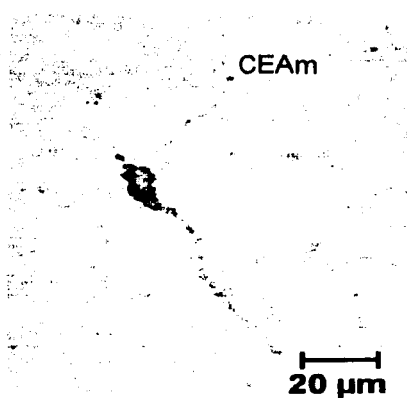


Fig. 22 Neurona inmunorreactiva a la N/OFQ
en el complejo estri-amigdalino (CEAm).



Fig. 23 Corte parasagital del telencéfalo
donde se muestran algunas neuronas aisladas
(†) y fibras (▼) inmunorreactivas a la N/OFQ.
PV: palio ventral.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

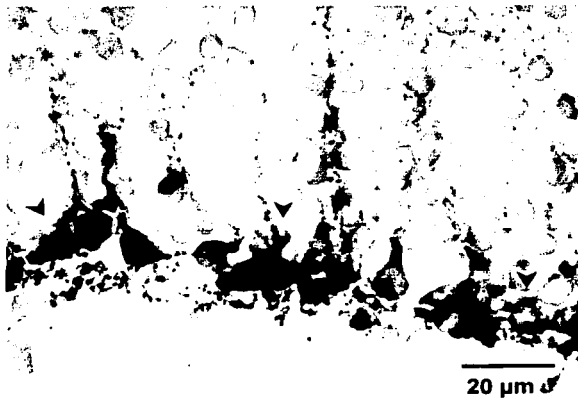


Fig. 24 Corte parasagital de telencéfalo donde se muestra la inmunorreactividad a la N/OFQ en neuronas del tectum (▼).

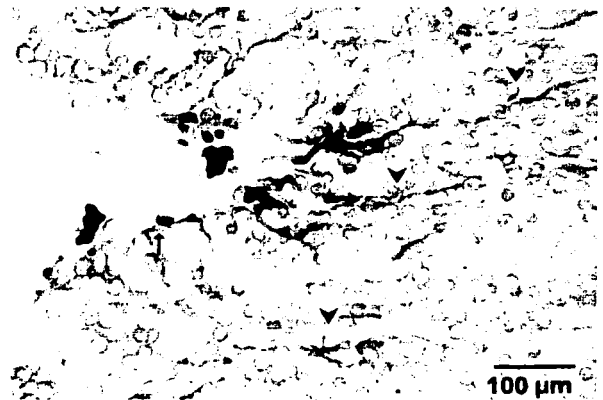


Fig. 25 Corte parasagital del telencéfalo del *A. mexicanum* mostrando la inmunorreactividad a la N/OFQ en neuronas y fibras (▼).

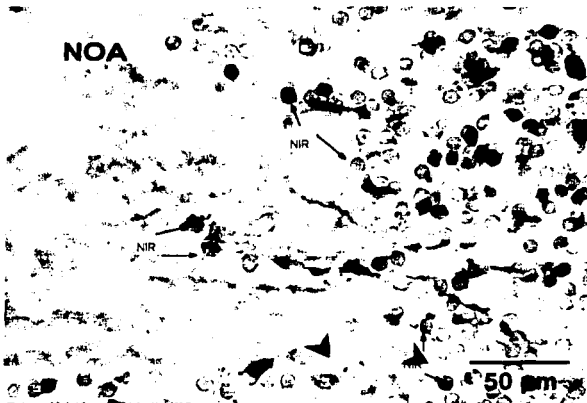


Fig. 26 Corte parasagital del cerebro del *A. mexicanum* mostrando la inmunorreactividad a la N/OFQ en neuronas (↑) del núcleo olfatorio anterior (NOA) y en la capa granular del bulbo olfatorio. También hay numerosas fibras IR (▼).



Fig. 27 Inmunorreactividad a la N/OFQ en una neurona del núcleo olfatorio anterior (NOA) del axolotl. Nótese el patrón granulado de la IR.

TESIS CON
VULVA DE ORIGEN





Fig. 28 Inmunofluorescencia a la N/OFQ en un corte parasagital de la hipófisis del *A. mexicanum*. La mayoría de las células del lóbulo intermedio (LI) muestran intensa inmunorreactividad. LA:lóbulo anterior, LN: lóbulo neural, In: infundíbulo.

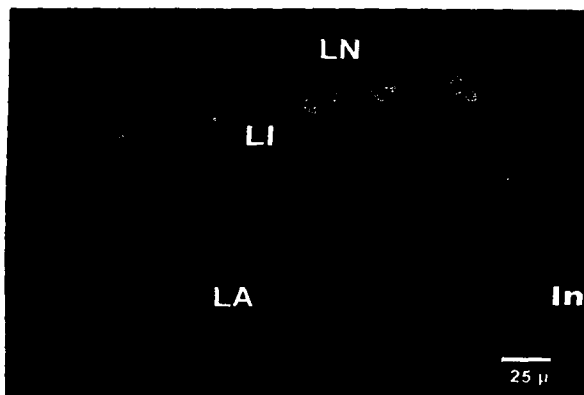


Fig. 29 Inmunofluorescencia a la β -endorfina en un corte parasagital de la hipófisis del *A. mexicanum*. La mayoría de las células del lóbulo intermedio (LI) muestran inmunorreactividad a la β -endorfina muy similar a la N/OF.

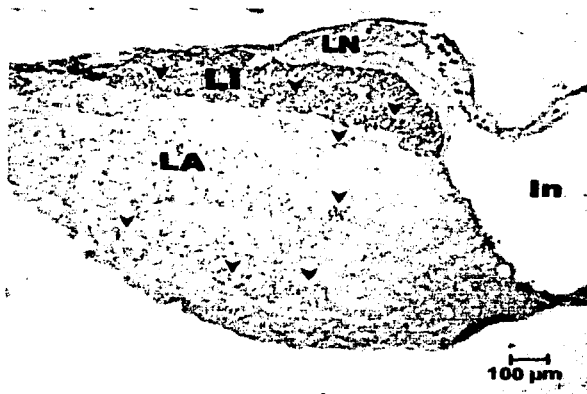


Fig. 30 Corte parasagital de la hipófisis del *A. mexicanum*. La mayoría de las células del lóbulo intermedio muestran intensa inmunorreactividad así como algunas células en el lóbulo anterior (▼). LA:lóbulo anterior, LN: lóbulo neural, In: infundíbulo.

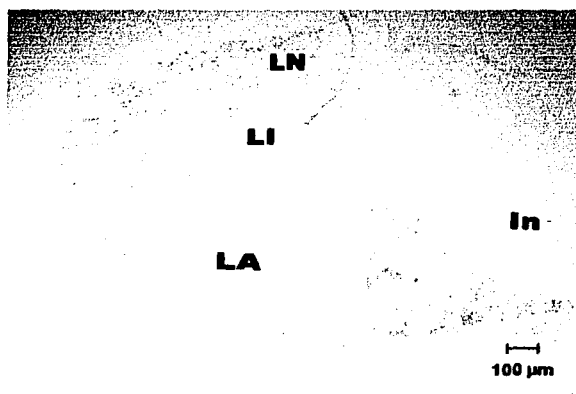


Fig. 31 Corte parasagital de la hipófisis. Preabsorción del anticuerpo anti-N/OFQ con su péptido sintético específico. Nótese la ausencia de Inmunorreactividad. LA:lóbulo anterior, LN: lóbulo neural, In: infundíbulo.

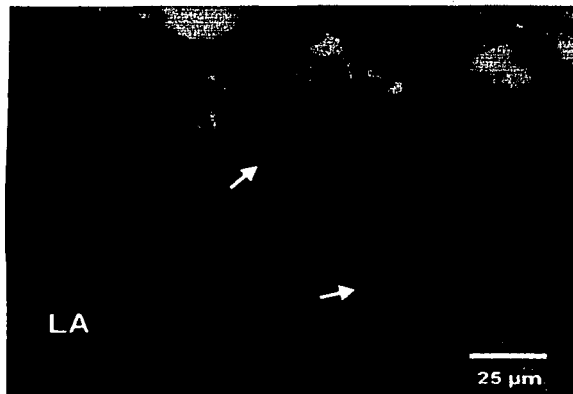


Fig. 32 Corte parasagital de lóbulo anterior de la hipófisis, se observa la inmunofluorescencia de células positivas a la N/OFQ (†). Nótese la inmunorreactividad y una ligera granulación en el citoplasma.

Fig. 33 Inmunofluorescencia de células positivas a la β -endorfina muy similar a la distribución de la N/OFQ (†) en el lóbulo anterior. Observe la IR citoplásmica.

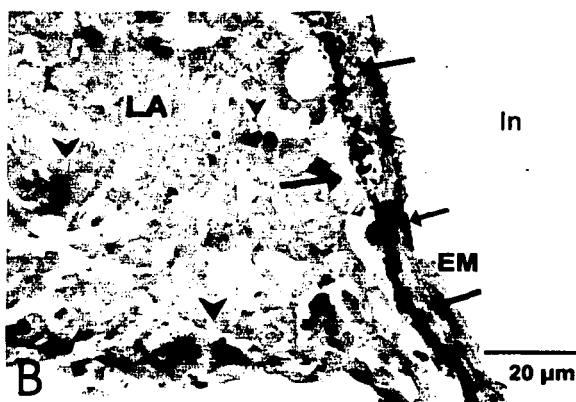
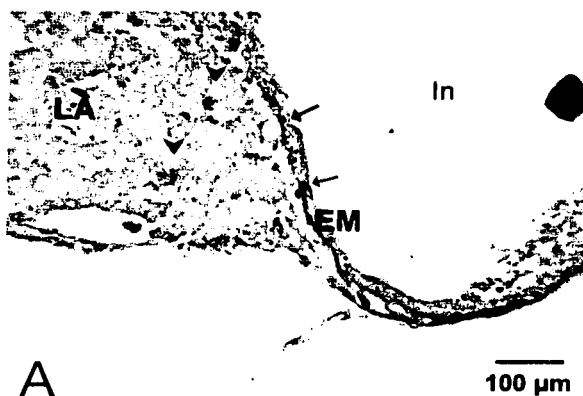


Fig. 34 Corte a nivel de la eminencia media. Nótese fibras vesiculadas IR a N/OFQ a lo largo de la eminencia media (†). También se observan células IR en el lóbulo anterior (∇). LA: lóbulo anterior, In: infundíbulo, EM: eminencia media. B aumento de la fig A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Análisis focal HIPOFISIS

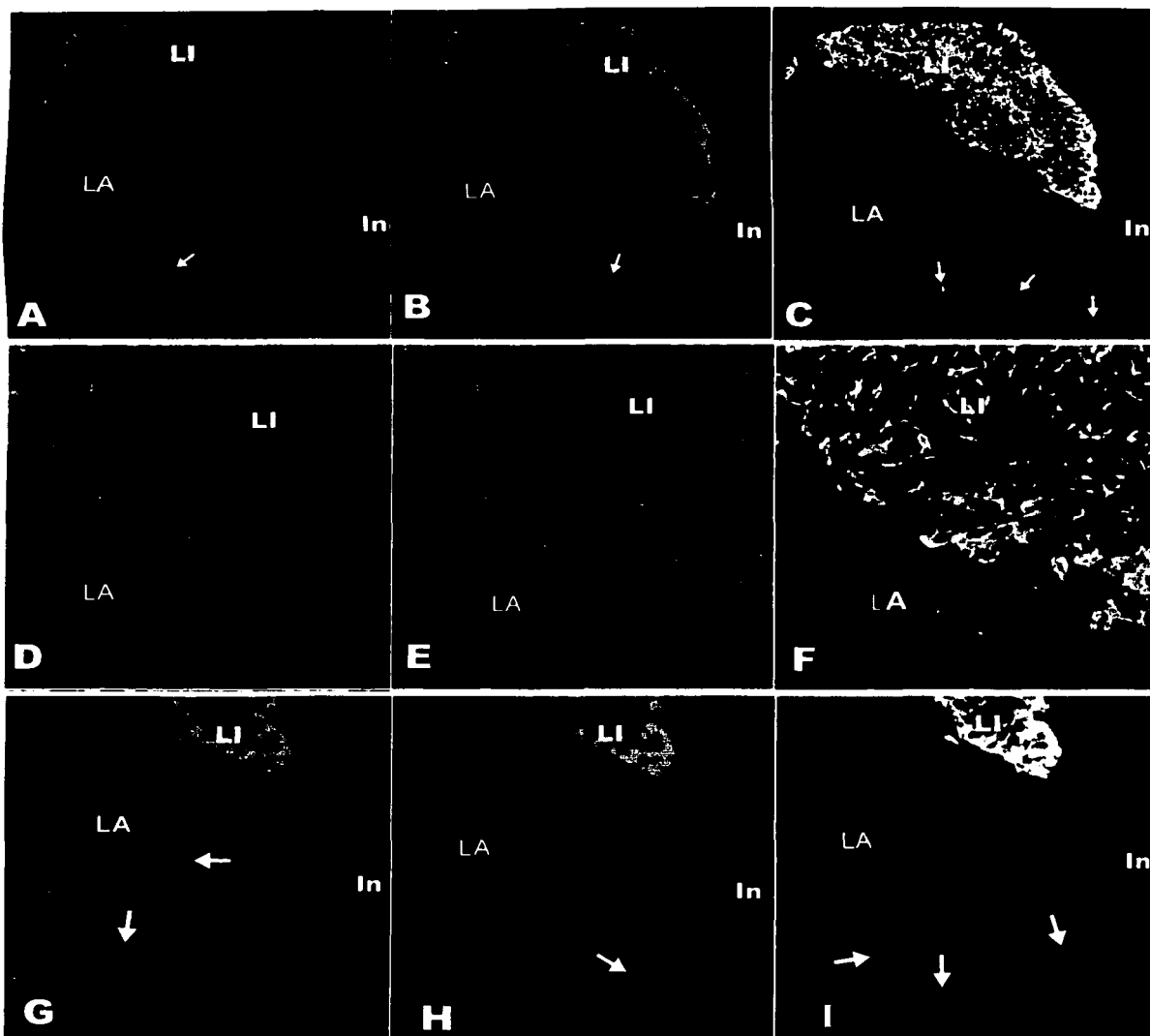


Fig. 35 Micrografías obtenidas con un microscopio confocal (Zeiss Axioskop 2) de cortes parasagitales de la glándula hipófisis del *A. mexicanum*. Las células en rojo de la fig. A muestran la inmunorreactividad (IR) a la β -endorfina (Rodamina-Red), en la fig. B en verde, la IR-N/O/FQ (Isocianato de Fluoresceína) y en la fig. C el color amarillo es la sobreposición de ambos péptidos. Los mismos péptidos para las fig. D, E y F respectivamente. Nótese que la mayoría de las células del lóbulo intermedio (LI) muestran intensa IR- β -endorfina muy similar a la IR-N/O/FQ (A, B, D, E). En la fig. G células del lóbulo anterior mostrando la IR-Leu-Enkefalina, fig. H la IR-N/O/FQ, fig. I la sobreposición de ambos en donde algunas células (\dagger) muestran IR-N/O/FQ, otras la IR- β -endorfina y pocas colocalizan.

LI: lóbulo intermedio, LA: lóbulo anterior, LN: lóbulo neural, In: infundíbulo.

fig. A, B y C aumento 10X. fig. D, E, F, G, H, I aumento 40X.



Análisis confocal Eminencia Media

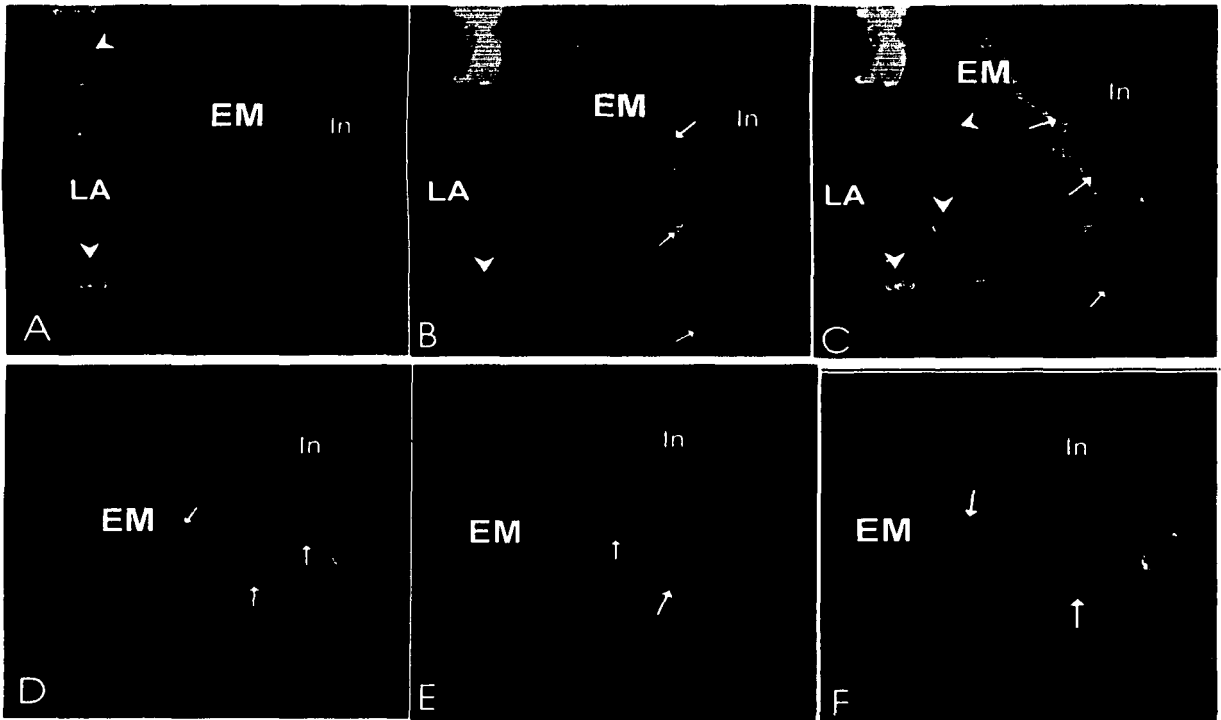


Fig. 36 Micrografías obtenidas con un microscopio confocal (Zeiss Axioskop 2 motorizado) de cortes parasagitales de la eminencia media mostrando fibras IR para la β -endorfina, Leu-Enkefalina y N/OFQ. **A**, IR a la β -endorfina (Rodamina-Red) en donde no se observan fibras IR en la eminencia media pero sí células IR (\blacktriangledown) en el lóbulo anterior hipofisario; **B** muestran la IR a la N/OFQ (FITC) en el que se observan fibras IR (\uparrow) en la eminencia media y células IR (\blacktriangledown) en el lóbulo anterior; **C**, la sobreposición de ambos péptidos, se observan algunas células (\blacktriangledown) del lóbulo anterior que muestran IR heterogénea para N/OFQ y para β -endorfina

D, muestra la IR para la Leu-Enkefalina (Rodamina-Red) en la que se observan algunas fibras IR (\uparrow); **E** la IR a la N/OFQ, también se observan algunas fibras IR; **F** la sobreposición de ambos péptidos. Nótese que no hay colocalización en las fibras

LA: lóbulo anterior, In: infundíbulo. EM: eminencia media. Todas la fotos 40X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



DISCUSIÓN

La localización anatómica de la N/OFQ en el sistema nervioso central del *Ambystoma mexicanum* demuestra que en este anfibio existe la nociceptina/orfanina FQ y tiene una amplia distribución en el cerebro del axolotl.

Las técnicas de la avidina-biotina-peroxidasa (ABC) y la de inmunofluorescencia, permitieron hacer un mapeo completo de la inmunorreactividad a la N/OFQ. Las neuronas, fibras y células evidenciadas con estas dos técnicas presentaron la misma distribución en las mismas zonas cerebrales, la técnica ABC fue la más sensible para hacer el mapeo.

La inmunorreactividad que se observó en el citoplasma de las neuronas de los diferentes núcleos cerebrales fue homogénea y el núcleo nunca tuvo inmunorreactividad.

Comparación con la distribución de la IR-N/OFQ y otros péptidos opioides en el axolotl y la rata:

En el núcleo olfatorio anterior (NOA) del axolotl y la rata (NOA posterior y ventral) existe IR-N/OFQ en neuronas y fibras (Neal y col., 1999; Mitsuma y col., 1998) (Fig. 26 y 27). En estos núcleos en el cerebro del axolotl se reportó una densidad media (++) de FIR para otros péptidos opioides como la Leu- y Met-Encefalina (Sánchez-Islas 1993). Se encontró que hay correspondencia pero no coexistencia de la N/OFQ con algunos péptidos opioides clásicos como son la β -endorfina, Leu- y Met-Encefalina, los cuales se reportaron en el *Ambystoma mexicanum*, *Rana ridibunda* y *Rana esculenta* (Vaudry y col., 1984; Merchenthaler y col., 1987, 1989; León-Olea y col., 1991; Sánchez-Islas y col., 1993). En el NOA del cerebro de rana y salamandra, diferentes autores reportaron también la existencia de otros neuropéptidos como la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), takinina y carnosina (ver revisión Andersen y col., 1992). La existencia de neuronas y fibras inmunorreactivas en este núcleo sugiere que la N/OFQ podría participar en la integración de la información olfatoria, en este sentido nuestro grupo reportó que en el procerebro del caracol *H. aspersa*, que es el ganglio en donde se procesa la información olfatoria, existen también neuronas y fibras inmunorreactivas a N/OFQ (León-Olea y col., 2001; Miller y col., 2002). La olfacción en el *Ambystoma*

mexicanum es importante para la percepción de su presa y en la conducta reproductiva al identificar las feromonas liberadas por su pareja (Butler y Hodos 1996).

Otras áreas del telencéfalo que presentaron una densidad alta (++++) de FIR y grupos de más de 10 NIR fueron; el palio dorsal, el palio piriforme, el complejo estriamigdalino, la comisura anterior y el área preóptica (Fig. 19-25). En la rata, la distribución de la N/OFQ incluye estas mismas áreas más la formación hipocampal y los ganglios basales (Neal y col., 1999; Mitsuma y col. 1998). En estas áreas telencefálicas también se reportó la existencia de Leu-Enkefalina y Met-Enkefalina en el *Ambystoma mexicanum* (León-Olea y col., 1986,1991; Sánchez-Islas 1993) y en la *Rana esculenta* (Merchenthaler y col., 1989).

En los vertebrados, el complejo palial dorsal, el estriamigdalino, y los núcleos basales participan en el control del movimiento (Butler y Hodos 1996). En el axolotl, parte de la actividad motora está regulada por el cuerpo estriado, parte anterior y posterior del tálamo ventral, pedúnculo, tegmentum istmico y tegmentum trigeminal (Herrick 1965), como se mencionó, en estos grupos neuronales existe IR para la N/OFQ, lo cual sugiere que este péptido puede participar modulando la actividad locomotora del *A. mexicanum*.

En la rata la administración de N/OFQ por diferentes vías modula la actividad locomotora, por ejemplo por vía i.c.v. (10 nM) disminuye la actividad locomotora, induce ataxia y pérdida de los reflejos posturales, la administración de N/OFQ (10 nM) directamente en el hipocampo aumenta la conducta exploratoria ante estímulos nuevos. Florin y colaboradores con dosis menores (5-50 pM), inhibieron la actividad locomotora y la conducta exploratoria en ratones (Reinscheid y col., 1995; Florin y col., 1996; Noble y Roues, 1997; Sandin y col., 1997; véase revisión Mucio y col., 2001).

En el diencefalo, las zonas con densidad alta (++++) de FIR fueron el tálamo, el hipotálamo y la eminencia media, en estas zonas se encontraron también grupos de NIR de más de 10 células (Fig. 15-18). El patrón de distribución FIR y NIR para la N/OFQ que se observó en el hipotálamo del axolotl fue similar al reportado para rata, en los núcleos mamilar lateral, paraventricular, supraóptico, anterior y laterales hipotalámicos (Fig. 16-18) (Neal y col., 1999; Mitsuma y col. 1998).

En la eminencia media, que es la zona de unión entre el hipotálamo y la glándula hipófisis (Butler y Hodos 1996) se observó que la mayoría de las FIR eran vesiculadas y

algunas un poco más gruesas, lo que hace suponer que hay un intenso transporte de éste péptido por estas fibras (Fig. 34 y 36).

En la glándula hipófisis, se observó una intensa inmunorreactividad en el citoplasma de las células del lóbulo intermedio y en algunas células del lóbulo anterior (Fig. 28-36). Este hallazgo es el primer reporte de la presencia de IR a N/OFQ en la glándula hipófisis, ya que en los trabajos anteriores realizados en rata, ratón y humano, no se encontró. La distribución de la N/OFQ en el lóbulo intermedio (LI) y anterior hipofisarios (LA) del axolotl es similar a la reportada para la β -endorfina (León-Olea y col., 1991). Para comprobar si existía colocalización o coexistencia en estas células, decidimos llevar a cabo experimentos de doble marcaje analizados con un microscopio confocal (Zeiss Axioskop 2). Nuestros resultados mostraron que la N/OFQ y la β -endorfina coexisten en las células del lóbulo intermedio así como en algunas células del lóbulo anterior, también se usó un anticuerpo anti-Leu-Encefalina (Fig. 35-36). Se demostró con técnicas inmunohistoquímicas que en los 3 lóbulos hipofisarios del axolotl y de otros anfibios se sintetizan diferentes péptidos opioides como son la Leu- y Met-enkefalinas, la dinorfina-A y la β -endorfina (León-Olea y col., 1986; León-Olea y col., 1991; Asai y col., 1998; Andersen y col., 1992; Sánchez-Islas 1993). Sin embargo, no había reportes de coexistencia de alguno de estos opioides con la N/OFQ.

En los sistemas hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) e hipotálamo-hipofisario-tiroideo (HPT), de los anfibios se sabe la acción neuroendócrina en la que participan algunas hormonas como son la del crecimiento (GH), estimuladora de los melanocitos (MSH), liberadora de la hormona tiroidea (TSH) la prolactina (PRL), así como sus efectos fisiológicos en la metamorfosis y en el metabolismo en general. En el caso de la PRL, se sabe que inhibe la metamorfosis del *Ambystoma tigrinum* por su acción inhibitoria sobre las hormonas tiroideas T3 y T4 (Gona y Etkin 1970; Fox 1983), lo que aún no se sabe es si la N/OFQ participa o modula de alguna manera estas vías endócrinas en los anfibios. En estudios recientes realizados en roedores, muestran que la N/OFQ es un regulador de la función neuroendócrina del eje hipotálamo hipofisario, la administración de N/OFQ vía i.c.v. (2.3-23 μ g/rata) en ratas con libre movimiento incrementan la secreción de la de PRL y GH (Repetto y col., 1999); la administración intracerebroventricular (i.c.v.) (0.1-1

nM) así como las microinyecciones en el hipocampo y en la amígdala producen una elevación en los niveles plasmáticos de corticosterona y de la hormona adrenocorticotropica (ACTH) sin embargo, aún no se conoce el mecanismo exacto de como actúa la N/OFQ en el eje HPA (Devine y col., 2001; Netti y col., 2002). La presencia de la IR-N/OFQ en los lóbulos intermedio y anterior de la hipófisis del axolotl así como su coexistencia con la β -endorfina en algunas células (Fig. 32-35) sugiere que éste péptido puede participar modulando la secreción de hormonas que se sintetizan en estos grupos. Entre ellas estarían la MSH que se sintetiza en el LI de los anfibios y aquellas que se sintetizan en el lóbulo anterior como son la GH, la PRL y la ACTH.

Los experimentos de inmunohistoquímica e hibridización *in situ* realizados en el cerebro de rata mostraron que la N/OFQ y su receptor ORL-1 están ampliamente distribuidos en los núcleos talámicos, núcleos mamilares mediales, núcleo Edinger-Westphal así como en las láminas II, III, IV, V, VI, VII de la ME (Mitsuma y col. 1998; Neal y col., 1999). Se demostró que la aplicación de N/OFQ produce una hiperalgesia rápida y una analgesia tardía, incremento en la sensibilidad al dolor y antinocicepción dependiendo básicamente de la dosis y vía de administración (Grisel y col., 1996; Xu y col., 1996; Tian y col., 1997; Taylor y Dickenson 1998). Martín y Stevens, (2002) al administrar N/OFQ vía intraespinal en la *Rana pipiens* observaron que se produce una analgesia significativa, al hacer la prueba del ácido acético que consiste en evaluar la respuesta conductual ante un estímulo nocivo que en este caso fue la aplicación de ácido acético en el muslo de la rana (Martín y Stevens 2002).

En el *A. Mexicanum*, el tectum, tegmentum, tálamo dorsal y médula espinal (ME) son zonas donde se integran mecanismos bulboespinales como son el control propioceptivo y actividades cerebrales superiores (Herryck 1965), en estas áreas, principalmente en el tectum, tegmentum e istmo se encontraron grupos de 5-7 NIR y una densidad ligera de FIR (Fig. 19), en la ME se observaron algunas NIR y una densidad baja de FIR a la N/OFQ (Fig. 8-13). La distribución de la N/OFQ en estas áreas del cerebro del axolotl sugiere que este neuropéptido participa en la nocicepción.

En ratas y ratones la N/OFQ se distribuye ampliamente en los núcleos cerebelares (Mitsuma y col. 1998; Neal y col., 1999), de manera similar se encontraron algunas NIR aisladas y una densidad escasa de FIR a la N/OFQ en el cerebelo del *A. mexicanum*.

Como se mencionó en el capítulo II (Fisiología de la N/OFQ), la administración de la N/OFQ modula la locomoción y la conducta exploratoria.

El cerebelo juega un papel primordial en los reflejos y en el control motor del axolotl (Herryck 1965), el encontrar inmunorreactividad a la N/OFQ en el cerebelo hace suponer que este péptido puede participar en los mecanismos de control motor que se integran en el cerebelo.

Los precursores de los péptidos opioides y la N/OFQ provienen de genes diferentes, sin embargo, tienen una alta homología lo que ha llevado a algunos grupos de investigación a trabajar en el campo de la filogenia. Danielson y Dores (1999), proponen la existencia de un gen ancestral presente en el esturión *Acipenser transmontanus*, que pudiera ser el precursor de la N/OFQ y de los opioides clásicos, ya que encontraron que la organización de la pronociceptina de este pez, es capaz de unirse al ORL-1 y a los receptores opioides con una afinidad casi igual. Este hecho aporta la evidencia de que el gen de la pronociceptina es una secuencia ancestral de donde se pudieron haber originado los genes de la prodinorfina y la proencefalina. Por otro lado en el molusco *Lymnaea stagnalis* se aisló el gen del receptor ORL-1 (Saunders y col., 2000) y en los moluscos *Cepaea nemoralis* y *Helix aspersa* la inyección de N/OFQ tiene un efecto pronociceptivo (Kavaliars, 1996; León-Olea y col., 2000) igual al de los mamíferos, por lo que estas evidencias apoyan el hecho de que este nuevo sistema opioide la N/OFQ y su receptor el ORL-1 tiene un origen filogenético temprano y una continuidad funcional durante el curso de la evolución.

Debido al reciente descubrimiento de la N/OFQ y a la distribución anatómica amplia de este péptido y su receptor en el sistema nervioso de la rata, en el caracol (Mitsuma y col., 1998; Neal y col., 1999; León-Olea y col., 2000) y ahora en el SNC del axolotl, resulta obvio que su participación en la fisiología y sus probables implicaciones farmacológicas todavía no están completas. El estudio de este sistema péptido receptor en diferentes animales permitirá un mejor conocimiento de la fisiología cerebral. La elaboración de agonistas y antagonistas de naturaleza no peptídica puede ayudar a tener las herramientas necesarias para entender el papel del sistema ORL1/N/OFQ en la fisiopatología y permitirá encontrar nuevas aplicaciones terapéuticas, como en el manejo del dolor, de los líquidos corporales, la regulación neuroendócrina etc.

CONCLUSIONES

1. En el *Ambystoma mexicanum* existe IR a la N/OFQ.
2. La IR a N/OFQ El SCN del *Ambystoma mexicanum* presenta una distribución anatómica amplia.
3. La distribución anatómica de la N/OFQ es similar a la reportada para la rata.
4. En la hipófisis la IR a N/OFQ se distribuye el lóbulo intermedio en algunas células del lóbulo anterior y en la eminencia media.
5. En los experimentos de doble marcaje para β -endorfina y N/OFQ analizados con microscopía confocal se encontró coexistencia de estos péptidos en las células del LI y algunas células del LA.
6. La distribución anatómica de la N/OFQ sugiere la posibilidad de que este péptido esté involucrado en los procesos neurosecretores y hormonales, en la modulación de la información sensorial, nociceptiva y en las respuestas fisiológicas al estrés de manera similar a lo reportado para la rata.
7. Estos hallazgos son relevantes para el estudio de la filogenia de los péptidos opioides y para la neuroendocrinología y fisiología de los anfibios.

ANEXOS

Anexo 1:

TÉCNICAS DE TINCIÓN Y GELATINIZACIÓN

Tinción de Nissl

Es una técnica de tinción para tejido nervioso, en la que se evidencian núcleos de color azul púrpura, sustancia de Nissl azul oscuro y citoplasma azul claro.

Sumergir los cortes en una solución de violeta de cresilo durante 10 minutos.

Lavar 3 veces en buffer fosfatos pH 4.0

Deshidratar en alcoholes graduales al 70%, 80%, 96% por 2 minutos cada uno.

Deshidratar en alcohol absoluto 2 cambios por 5 minutos.

Aclarar en xilol 2 veces por 5 minutos

Montar en resina sintética.

Solución de violeta de cresilo:

Violeta de cresilo 0.5 g

Disolver en 100 ml de solución amortiguadora de acetatos.

Solución amortiguadora de acetatos:

Disolver 5.4 g de acetato sodio en 100 ml de agua destilada.

Agregar 9.2 ml de ácido acético glacial

Aforar a un litro con agua destilada y ajustar pH 7.4

Contratinción con safranina alcohólica

Sumergir el tejido en una solución de safranina alcohólica al 70% durante 1 o 2 minutos.

Deshidratar en alcoholes graduales al 70%, 80%, 96% por 2 minutos cada uno.

Deshidratar en alcohol absoluto 2 cambios por 5 minutos.

Aclarar en xilol 2 veces por 5 minutos

Montar en resina sintética.

Portaobjetos gelatinados.

Llenar una gradilla de portaobjetos.

Sumergir por 30 minutos en agua jabonosa en agitación.

Lavar en agua corriente durante 15 minutos

Lavar en agua destilada

Sumergir en gelatina cuidando que no se peguen entre ellos.

Colocar en una caja cerrada con papel secante en el fondo hasta secar.

Solución gelatinizante:

Gelatina 5.0 g

Sulfato de potasio crómico 0.5 g (cromoalúmina; esta sirve para aclarar la gelatina amarillenta y como desinfectante).

Disolver en 1 litro de agua destilada caliente.

Filtrar con papel Wattman # 4 y enfriar.

Los portaobjetos una vez gelatinados pueden mantenerse a temperatura ambiente por 3 meses.

Anexo 2:

SOLUCIONES FIJADORAS

Paraformaldehído al 4%

Este fijador se prepara en el momento de su uso.

Pesar 40 g de paraformaldehído y disolver en 1l de PBS 0.1 M, pH 7.4

Calentar a 50°C con agitación, hasta que la solución se aclare.

Enfriar a 4 °C.

Filtrar con papel Wattman del # 4.

Paraformaldehído al 4%, más pícrico al 0.2%

A la solución de paraformaldehído al 4% en PBS.

Agregar 2 g de ácido pícrico por cada litro de paraformaldehído recién preparado. Enfriar a 4 °C.

Filtrar con papel Whatman del # 4

Paraformaldehído al 4%, más Acroleína al 2%

La acroleína es un aldehído estable, sin embargo, es cancerígeno y muy corrosivo, por lo que hay que tener todas las precauciones de uso.

Como en los fijadores anteriores, se utiliza la solución de paraformaldehído al 4% recién preparada.

Agregar 2.5 ml de acroleína por cada 100 ml de paraformaldehído, en este el fijador se mantiene a temperatura ambiente para evitar la precipitación de la acroleína, la velocidad de fijación debe ser lenta (4ml/min aprox). Para animales pequeños como el axolotl y la rata se recomienda usar 300ml/250g de peso.

Periodato/Lisina/Paraformaldehído (PLP)

Este fijador es recomendado para localizar glicoproteínas de membrana y neuropéptidos citoplasmáticos.

Paraformaldehído al 8%, 250 ml (20 g en 250 ml de agua destilada), enfriar y filtrar.

Preparar 100 ml de Na_2HPO_4 0.1 M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.68 g mas agua destilada, (se puede almacenar a 4 °C).

Lisina 0.4 M.

Disolver 14.6 g de lisina en 200 ml de agua destilada el pH de esta solución es de 5.6.

Ajustar el pH a 7.4 con 70 ml. aprox. de la solución de fosfatos y aforar con agua destilada a 400 ml. Aforar esta solución a 800 ml con amortiguador de fosfatos salino 0.1 M pH 7.4.

Agregar 250 ml de paraformaldehído a 750 ml de la solución L-lisina/fosfato

Agregar 2.4 mg/ml de meta-periodato de sodio inmediatamente antes de la perfusión.

Anexo 3

PERFUSIÓN

Protocolo de perfusión de *Ambystoma mexicanum*

Anestesiarse por inmersión en una solución de benzocaína al 0.02 %

Benzocaína 0.2 g

Alcohol absoluto 10 ml

Disolver y aforar a un litro con agua destilada.

Perfusión

Se lleva a cabo en la campana de extracción.

Solución fijadora 300 ml (ver anexo 2) para un ajolote de 100 -120 g.

Se cubre al animal con hielo y se coloca dorsalmente.

Levantar la piel del tórax y hacer una incisión longitudinal medial a la altura de las extremidades anteriores. Abrir y separar los cartílagos torácicos. Exponer el corazón.

Introducir la aguja de perfusión en el ventrículo y sujetarla con una pinza.

Hacer una incisión en la aurícula derecha.

Inyectar en el ventrículo 30 U.I. de heparina.

Pasar aprox. 200 ml de solución salina fisiológica fría (0.9 g NaCl/100 ml agua destilada).

Pasar 350 ml de la solución fijadora.

Disección del Cerebro

Se hace incisión longitudinal a nivel del surco medio, en la piel de la parte dorsal de cráneo, se separa con un bisturí y se quita el hueso con una gubia hasta exponer el cerebro. Este se separa cuidadosamente cortando los nervios olfatorios y craneales. Se extrae el cerebro.

Postfijación: El cerebro se sumerge en el fijador por 2 a 4 h a 4°C.

Crioprotección:

El tejido ya postfijado se sumerge en una solución de sacarosa al 30 % en PBS.

Mantener en refrigeración hasta su procesamiento.

Anexo 4:

TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Técnica de inmunofluorescencia indirecta

Se lleva a cabo en los cortes montados en los portaobjetos gelatinados.

-Bloqueo de sitios reactivos 1 hora a temperatura ambiente (t.a.).

Solución de bloqueo

PBS 0.1 M pH 7.4

albúmina sérica bovina (ASB, Sigma) al 5 %

Suero normal de cabra (SNC), 5%

tween-20 al 0.3% (Sigma).

-Incubación con el primer anticuerpo en una cámara húmeda, 48 hrs. a 4 °C.

Primer anticuerpo 1:10 (anti-N/OFQ).

PBS 0.1 M pH 7.4

ASB 5 %

Suero normal de cabra (SNC), 5%

gelatina de pescado (Sigma), 1%

tween-20, 0.3%

Lavar los tejidos tres veces por 5 minutos con PBS 0.1 M, pH 7.4

Incubación del segundo anticuerpo en una cámara húmeda a 37 °C durante 2 h.

(IgG anti-conejo, desarrollado en cabra y conjugado con isotiocianato de fluoresceína; ICN™)

dilución 1:50

PBS 0.1 M pH 7.4

Tween-20 al 0.3%

ASB 5 %, SNC 5%

Trabajar el anticuerpo fluorescente con luz indirecta de baja intensidad.

Lavar tres veces por 5 min. con PBS 0.1 M, pH 7.4

Montar el cubreobjetos con Antifade (Molecular Probes®), protegerlos de la luz y mantenerlos a 4 °C

Observar en el microscopio de fluorescencia y fotografiar.

Técnica inmunohistoquímica de ABC (avidina-biotina)

Bloquear la peroxidasa endógena del tejido en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.003% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Lavar 3 veces por 5 minutos con PBS.

Bloquear los sitios reactivos con una solución bloqueadora durante 1 hora a. t. a.

Solución bloqueadora:

PBS 0.01 M, pH 7.4

ASB, 5 %

SNB 5 %

Tween-20 al 0.3%

Quitar el exceso de solución de bloqueo.

Incubar el primer anticuerpo a una dilución 1:20 en una cámara húmeda, 48 h a 4 °C.

Solución de dilución:

PBS 0.1 M pH 7.4

ASB 5 %

SNB 5%

Gelatina de pescado 1%

tween-20 al 0.3%

Lavar 3 veces por 5 minutos en PBS + Tween 20 al 0.3%.

Incubar con el segundo anticuerpo a una dilución 1:500, en una cámara húmeda por 2 horas a t.a.

Segundo anticuerpo: IgG anti-conejo biotilnado, desarrollado en burro (Jackson Immuno-Research®)

Solución de dilución:

PBS,

SNB 5%

ASB 5%

Tween 20 al 0.3%.

Lavar con PBS 3 veces por 3 minutos.

Incubar con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC; *Elite Vectastain Kit*) por una hora a temperatura ambiente.

Revelar la peroxidasa

Solución de revelado:

PBS 0.001 M, pH 7.4 26ml

Diaminobenzidina tetrahidroclorinada (Sigma) 1 tableta de 10 mg.

Sulfato de níquel al 30% 300 μ l.

Peróxido de hidrógeno al 30% 3 μ l.

Tomar el tiempo en el que se revela mejor la peroxidasa en un corte experimental (3 a 5 min) y ese mismo tiempo se le da a todas las preparaciones incluyendo los controles.

Parar la reacción y lavado con PBS 0.001 M, pH 7.4 a 4 °C.

Secar el tejido.

Deshidratar en alcoholes graduales.

Aclarar con Xilol.

Montar con resina sintética.

Observar en el microscopio y tomar fotografías.

BIBLIOGRAFIA

1. AKIL H, MENG F, DEVINE D, WATSON S: Molecular and neuroanatomical properties of the endogenous opioid system: implications for the treatment of opiate addiction. *Seminars in neuroscience* 9:70-83, 1997.
2. ANDERSEN A, TONON M, PELLETIER G, CONLON J, FASOLO A, VAUDRY H: Addendum to: Neuropeptides in the amphibian brain. *International Review of Cytology* 138:315-326, 1992.
3. ANDERSEN A, TONON M, PELLETIER G, CONLON J, FASOLO A, VAUDRY H: Neuropeptides in the amphibian brain. *International Review of Cytology* 138:89-210, 1992.
4. ANTON B, FEIN J, TO T, LI X, SILBERSTEIN L, EVANS, C: Immunohistochemical localization of ORL-1 in the central nervous system of the rat. *Comp. Neurol.* 368:229-251, 1995.
5. ARMSTRONG J, MALACINSKI G: *Developmental Biology of the axolotl*. Oxford University Press, New York, 319 pp. 1989.
6. ARNDT M, WU D, SOONG Y, SZETO H: Nociceptin/orphanin FQ increases blood pressure and heart rate via sympathetic activation in sheep. *Peptides* 20(4):465-470. 1999.
7. ASAI M, CANO A, TALAVERA E, ZUBIETA M: IR-Leu enkephalin content in the axolotl brain *Ambystoma mexicanum*. *Neuropeptides*. 12:41-42, 1988.
8. BACH F: Beta-endorphin in the brain. A role in nociception. *Acta Anaesthesiol Scand* 41:133-40, 1997.
9. BEFORT K, MATTEI MG, ROECKEL N, KIEFFER B: Chromosomal localization of the δ opioid receptor gene to human 1p34.4-p36.1 and mouse 4D bands by *in situ* hybridization. *Genomics* 20:143-145, 1994.
10. BRADBURY A, FELDBERG W, SMYTH D, SNELL C: Lipotropin C, Fragment and endogenous peptide with potent analgesic activity. En: Kosterlitz, H. (Ed). *Opiates and endogenous opioid peptides*. Elsevier, Amsterdam, 9-17, 1976.
11. BRIAN E, GRAZIANO M, LAMBERT D: Cellular actions of nocieptin: transduction mechanisms. *Peptides* 21:961-967, 2000.
12. BROWNSTEIN J, RUSSEL T, GAINER H: Synthesis, transport and release of posterior pituitary hormones. *Science*, 207: 373-378, 1980.
13. BUATTI M, PASTERNAK G: Multiple opiate receptors: philogenetic differences. *Brain. Res.* 1218:400-405, 1981.
14. BUNZOW JR, SAEZ C, MORTURD M, BOUVIER C, WILLIAMS JT, LOW M, GRANDY DK: Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a μ , δ or κ opioid receptor type. *FESB Lett.* 347:279-283, 1994.
15. BUTLER A, HODOS W: *Comparative vertebrate neuroanatomy, evolution and adaptation*. Wiley-Liss New York, 1996.
16. BUTOUR J-L, MOISAND CH, MOLLEREAU C, MEUNIER J-C: Phe1 Ψ (CH₂-NH)Gly₂Nociceptin(1-13)NH₂ is an agonista of the nociceptin (ORL1) receptor: *Eur J of Pharmacol* 349:R5-R6, 1998.
17. CALO G, GUERRINI R, RIZZI A, SALVADORI S, REGOLI D: Pharmacology of nociceptin and its receptors: a novel therapeutic target: *Brith Jour Pharmacol* 129:1261-83, 2000.
18. CALO G, GUERRINI R, RIZZI A, SALVADORI S, REGOLI D: Pharmacology of nociceptin and its receptors: a novel therapeutic target. *Brith Jour Pharmacol* 129:1261-83, 2000.
19. CHAMPION H, KADOWITZ P: Nociceptin, an endogenous ligand for the ORL(1) receptor, has novel hypotensive activity in the rat. *Life Sci* 60:241-45, 1997.

20. CHANG K, GAINER H, RUSSELL J, LOH Y: Proopiomelanocortin-converting enzyme activity in bovine neurosecretory granules. *Endocrinology*, 111: 1607-1614, 1982.
21. CHEN Y, FAN Y, LIU J, MESTEK A, TIAN M, KOZAK CA, YU L: Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FESB Lett* 347:2799-283, 1994.
22. COLEMAN C, HESSLER A: Thyroxine induced metamorphosis in a neotenic axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Axolotl Newsletter* 26:4-9, 1997.
23. COMB M, SEEBURG P, ADELMAN J, EIDEN L, HEBERT E: Primary structure of the human Met- and Leu- enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*, 295:663-4, 1982.
24. CONNOR M, VAUGHAN C-W, CHIENG B, CHISTIE M-J: Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurones in vitro. *Br J Pharmacol* 119(8):1614-8 1996.
25. CONSTANTIN J, FLORIN S, SUAUDEAU C, MEUNIER J-C: Le clonage de la pré-nociceptine fait découvrir d'autres peptides biologiquement actifs. *C. R. Soc. Biol.* 192:1099-1209, 1998.
26. COONS A H: Fluorescent antibody methods. In general cytochemical methods (Daniel H JF, Eds.) pp 349-422. Academic Press, NY, USA, 1958.
27. DANIELSON P, DORES M: Molecular evolution of the opioid orphanin gene family. *Gen Comp Endocrinol* 113:169-86, 1999.
28. DANIELSON PB, HOVERSTEN MT, FITZPATRICK M, SCHRECK C, AKIL H, DORES RM: Sturgeon orphanin: A molecular "Fossil" that bridges the gap between the opioids and orphanin FQ/N. *J Biol Chem.* 2001.
29. DARLAND T, HEINRICHER M, GRANDY D: Orphanin FQ/nociceptin: a role in pain and analgesia, but so much more. *Trend neurosci* 21:215-221, 1998.
30. DAWSON-BASOA M, GINTZLER A: Nociceptin (Orphanin FQ) abolishes gestational and ovarian sex steroid-induced antinociception and induces hyperalgesia. *Brain Res* 750:48-52, 1997.
31. DEVICHE P, MOORE F: Biochemical characterization and a urodele distribution of 3H-naloxone binding sites in a urodele amphibian. *Soc. Neurosci. Abs.* 392.4:981, 1989.
32. DEVINE P, TAYLOR L, REINSCHIED R, MONSMA F, CIVELLI O, AKIL H. Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. *Neuro Res* vol. 21 (11) 1387-1396, 1996.
33. DEVINE P, WATSON S, AKIL H: Nociceptin/Orphanin FQ regulates neuroendocrine function of the limbic Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis. *Neuroscience* 102: 541-553, 2001.
34. DING Y, KANEKO T, MOMURA S: Immunohistochemical localization of μ -opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 367: 375-402, 1996.
35. DOOLEY C, HOUGHTEN R: Orphanin FQ/Nociceptin receptor binding studies. *Peptides* 21:949-60, 2000.
36. ETAYO J, MONTUENGA L, SESMA P, DÍAZ DE RADA, ROVIRA J, VILLARO A: Characterization of pancreatic endocrine cells of the European common frog *Rana temporaria*. *Gen Comp. Endocrinol* 117:366-80, 2000.
37. EVANS C, KEIT J, MORRISON J, MAGENDZO H, EDWARD R: Cloning of delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258:1952-1955, 1992.
38. FISCHLI W, GOLDSTEIN A, HUNKAPILLER M, HOOD L: Isolation and amino acid sequence analysis of a 4,000 dalton dynorphin from porcine pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5435-5437, 1982.
39. FLORIN S, SUAUDEAU C, MEURIER J-C, COSTENTIN J: Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. *Eur J Pharmacol* 317:9-13, 1996.
40. FOX HAROLD. Amphibian morphogenesis. Ed. Humana Press. New Jersey, USA, pp. 326-396, 1983.

41. FUKUDA K, KATO S, MORI K, NISHI M, TAKESHIMA H, IWABW N, MIYATA T, HOUTANI T, SIGIMOTO T: cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FESB Lett.* 342:42-46, 1994.
42. GINTZLER A, ADAPA I, TOLL L, MEDINA V, WANG L: Modulation of enkephalin release by nociceptin (orphanin FQ). *Eur J Pharmacol* 325:29-34, 1997.
43. GIULIANI S, LECCI A, MAGGI A: Nociceptin and neurotransmitter release in the periphery. *Peptides* 21:977-984, 2000.
44. GIULIANI S, MAGGI C: Inhibition of tachykinin release from peripheral nerve endings of sensory nerves by nociceptin, a novel opioid peptide. *Brit J Pharmacol* 118:1567-69, 1996.
45. GOLDSTEIN A, TACHIBANA S, LOWNEY L, HUKAPILLER M, HOOD L: Dynorphin(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 6666-6670, 1979.
46. GONA A, ETKIN W. Inhibition of metamorphosis in *Ambystoma tigrinum* by prolactin. *Gen comp. Endocrinol* 14:589-603, 1970.
47. GRAF L, KENESSEY A, PATTY A, GRUNBAUM A, MARKS N, LAJTHA A: Cathepsin D generates gamma endorphin from beta-endorphin. *Arch. Biochem. Biophys.* 193: 101-109, 1979.
48. GRANDY K: 27th Meeting of Internatl. Narcot Res. Conf. (INRC) Abstr 29:S3-3, 1996.
49. GRIEBEL G, PERRAULT G, SANGER D: Orphanin FQ, a novel neuropeptide with anti-stress-like activity. *Brain Res* 836:221-224, 1999.
50. GRISEL J, MOGIL J, BELKNAP J, GRANDY D: Orphanin FQ acts as a supraspinal, but not spinal anti-opioid peptide. *Neuroreport* 7:2125-9, 1996.
51. GUBLER U, SEEBURG P, HOFFMAN B, GAGE P, UDENFRIEND S: Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* 295:206-8 1982.
52. GUTIÉRREZ R, LEFF P, ROMO-PARRA H, ACEVEDO R, ANTÓN B: Orphanin-FQ/nociceptin inhibits kindling epileptogenesis and enhances hippocampal feed-forward inhibition. *Neurosciences* 105 (2): 325-333, 2001.
53. HARDMAN J: The pharmacological basis of therapeutics. Mc Graw Hill, New York, 1996.
54. HARLOW E, LANE D: Antibodies, a Laboratory Manual, Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1988.
55. HAWES B, GRAZIANO M, LAMBERT D: Cellular actions of nociceptin: transduction mechanisms. *Peptides* 21:961-67, 2000.
56. HERRICK J: The Brain of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum*. The University of Chicago Press, Chicago, 1965, 407 pp.
57. HOCKFIELD S, CARLSONS, EVANS C, LEVIRT P, PINTAR J, SILBERTEIN I. Select methods for antibody and nucleic acids probes Vol 1. CSHC Press. 1993, 679 pp.
58. HOUTANI T, NISHI M, TAKESHIMA H, NUKUDA T, SUGIMOTO T: Structure and regional distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219:714-719, 1996.
59. HUGHES S: Isolation of an endogenous compound from the brain whit pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res* 88:295-308, 1975.
60. JENCK F, MOREAU J, MARTIN J, KILPATRICK G, REINSCHIED R, MONSMA F, NOTHACKER H, CIVELLI O: Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:14854-14858, 1997.
61. JENCK F, WICHMANN J. DAUTZENBERG F, MOREAU J, OUAGAZZAL A, MARTIN J, LUNDOSTROM K, CESURA A, POLI S, ROEVEN S, KOLCZEWSKI, ADAM G, KILPATRICK G: A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL-1: anxiolytic profile in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:4938-4943, 2000.

62. KACHATURIAN H, LEWIS E, SCHAFFER K, WATSON S: Anatomy of the CNS opioid systems. *Trends Nerv Sys* 8: 111-118, 1985.
63. KAKIDANI H, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, NODA H, MARIMATO Y, HIROSE T, ASAI M: Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine B-neoendorphin-dynorphin precursor. *Nature*. 298:245-249, 1982.
64. KAKIYA S, MURASE T, ARIMA H, YOKOI H, IWASAKI Y, MIURA Y, OISO Y: Role of endogenous nociceptin in the regulation of arginine vasopressin release in conscious rats. *Endocrinol* 141:4466-4471, 2000.
65. KANDEL E, SCHUARTZ J, JESSELL T: Principles of neural science. Mc Graw Hill, New York. 2000. 1414 pp.
66. KAPUSTA D, CHANG J, KENIGS V: Central administration of [Phe¹(p(CH₂-NH)Gly²)Nociceptin(1-13)-NH₂ and orphanin FQ/nociceptin (OFQ/N) produce similar cardiovascular and renal responses in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* vol. 289(1): 173-180, 1999.
67. KAPUSTA D, KENIGS V: Cardiovascular and renal responses produced by central orphanin FQ/nociceptin occur independent of renal nerves. *Am J Physiol* 277 (46):R987-995, 1999.
68. KAPUSTA D, SEZEN S, CHANG J-K, LIPPTON H, KENINGS V: Diuretic and antinatriuretic responses produced by the endogenous opioid-like peptide, nociceptin (orphanin FQ). *Life sci* 60(1):15-21, 1997.
69. KAPUSTA D: Neurohumoral effects of orphanin FQ/Nociceptin: relevance to cardiovascular and renal function. *Peptides* 21:1081-1099, 2000.
70. KAVALIERS M, PERROT-SINAL T: Pronociceptive effects of the neuropeptide, nociceptin, in the land snail, *Cepaea nemoralis*. *Peptides* 17(5):763-768, 1996.
71. KAVALIERS M: Evolutionary and comparative aspect of nociception. *Brain Res. Bull.* 21:923-931, 1988.
72. KEITH D, MAUNG T, ANTON B, EVANS C: Isolation of cDNA clones homologous to opioid receptors. *Reg Peptides* 54:143-144, 1994.
73. KIEFFER B, BEFORT K, GAVERIAUX-RUFF, HIRTH CH: The delta-opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:12048-12052, 1992.
74. KIEFFER BL: Molecular aspects of opioid receptors. In: Dickerson A, Besson J-M. (Eds.) Pain, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, Berlin, Heidelberg. 130:281-303, 1997.
75. KÖSTER A, MONTKOWSKI A, SCHULZ S, STUBE E, KNAUDT K, JENCK F, MOREAU J, NOTHACKER H, CIVELLI O, REINSCHIED R: Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:10444-10449, 1999.
76. KOSTERLITZ H, TENERIUS Y: Pain and society. Weinheim, Verlag Chemie GmbH pubs. USA. 1980, 13-36 pp.
77. LECAUDE S, ALRUBAIAN J, SOLLARS C, PROPPER C, DANIELSON P, DORES R: Organization of proenkephalin in amphibians: cloning of a proenkephalin cDNA from the brain of the anuran amphibian, *Spea multiplicatus*. *Peptides* 21(3):339-44, 2000.
78. LEFF P, MARTINEZ I, ACEVEDO R, CALVA J, LEÓN-OLEA M, CRUZ S, ANTÓN B: A comprehensive immunohistochemical mapping of nociceptin/orphanin FQ peptide in the CNS of rat. *Neurosci Abst* 24(1):854, 1998.
79. LEFF P, MARTINEZ I, ACEVEDO R, CALVA J, LEÓN-OLEA M, CRUZ S, ANTÓN B: A comprehensive immunohistochemical mapping of nociceptin/orphanin FQ peptide in the CNS of the rat. *MethodsFinder*, <http://www.methodsfinder.org>, 1999.
80. LEÓN-OLEA M, MILLER-PÉREZ C, SÁNCHEZ-ISLAS E, ANTÓN B, PELLICER F, MUCIO-RAMÍREZ S: Pronociceptive effects and neuroanatomical distribution of the

- neuropeptide Nociceptin/Orphanin FQ in the land snail, *Helix aspersa*. 2nd World Congress of World Institute of Pain (Abs. Num. BR 10) June 27-30, 2001. Istanbul-Turkey.
81. LEÓN-OLEA M, MILLER-PÉREZ C, SÁNCHEZ-ISLAS E, PELLICER F, ANTÓN B, MUCIO-RAMÍREZ S: Caracterización anatómica y funcional de la Nociceptina/Orfanina FQ en los ganglios periesofágicos del caracol *Helix aspersa*. I Congreso de responsables de proyecto de investigación en ciencias naturales, CONACYT. Veracruz Ver. México, 8-11 de octubre del 2000.
 82. LEÓN-OLEA M, SÁNCHEZ ALVAREZ M, PIÑA A, BRIONES VELASCO M, BAYÓN A: Distribución morfológica de Leu-enkefalina y B-endorfina en la hipófisis del axolotl (*Ambystoma mexicanum*). XXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Guanajuato, Gto. Agosto 17-20, 1986.
 83. LEÓN-OLEA M, SÁNCHEZ-ALVAREZ M, PIÑA A, BAYÓN A: Evidence for enkephalin and endorphin immunoreactivity cells in the anterior pituitary of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J. Comp. Neurol.* 305:412-420, 1991.
 84. LEÓN-OLEA M: Los péptidos opioides como proteínas ancestrales: estudio inmunohistoquímico en el molusco *Helix aspersa* y en el anfibio *Ambystoma mexicanum*. XXX VI Congreso Nacional ciencias fisiológicas. Acapulco Gro, 1993.
 85. LEROIT D, LIOTTA A, ROCH J, SHILOACH J, LEWIS M, PERT C, KREIGER D: Corticotropin and β -endorphin like materials are native to unicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:2086-2090, 1982.
 86. MAMIYA T, NODA Y, NISHI M, TAKESHIMA H, NABESHIMA T: Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice. *Brain Res* 783:236-240, 1998.
 87. MANABE T, NODA Y, MAMIYA T, KATAGIRI H, HOUTANIT, NISHI M, NODA T, TAKAHASHI T, SUGIMOTOT, NABESHIMA T, TAKESHIMA H: Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature* vol. 394 /6, 1998
 88. MANSOUR A, BURKE S, PAVLIC J: Immunohistochemical localization of the cloned k1 receptor in the rat CNS and pituitary. *Neuroscience* 71:671-690, 1996.
 89. MANSOUR A, FOX A, AKIL H: Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: Anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18: 22-29, 1995.
 90. MANSOUR A, FOX CA, BURKE S, MENG F, THOMPSON RC, AKIL H, WATSON SJ: Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350:412-38, 1994.
 91. MANSOUR A, HOVERSTEN M, TAYLOS P, WATSON J, AKIL H: The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands; evidence for two opioid peptide recognitions cores. *Brain Res.* 700:89-98, 1995.
 92. MANSOUR A, LEWIS E, KACHATURIAN H: Autoradiographic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci* 7:2445-2464, 1987.
 93. MARCHESE A, DOCHERTY JM, NGUYEN T, HEIBER M, CHENG R, HENG HH, TSUI L, SHI X, GEORGE S, O'DOWN F: Cloning of human genes encoding novel G protein-coupled receptors. *Genomics* 23:609-618. 1994.
 94. MARTENS G, CIVELLI O, HERBERT H: Nucleotide sequence of cloned cDNA for proopiomelanocortin in the amphibian *Xenopus leavis*. *J. Biol Chem* 260:13685-13689, 1985.
 95. MARTENS G, HERBERT E: Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus leavis*. *Nature* 310:251-254, 1984.
 96. MARTIN K, AND STEVENS C. Analgesia effects of nociceptin in amphibians. *Soc. Neurosci. Abs.* 553.2, 2002.

97. MERCHENTHALER I, MADERDRUT J L, LAZAR G, GULYAS J, PETRYSZ P: Immunocytochemical analysis of proenkephalin-derived peptides in the amphibian hypothalamus and optic tectum. *Brain. Res.* 416:219-227, 1987.
98. MERCHENTHALER I, MADERDRUT J, ALTSCHULER RM, PETRUSZ P: Immunocytochemical localization of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 17: 325-48. 1986.
99. MEUNIER J: Nociceptin/orphanin FQ an the opioid receptor like ORL1 receptor. *Eur Jour Pharmacol* 340:1-15, 1997.
100. MEUNIER, J-C, MOLLEREAU C, TOLL L, SUAUDEAU C, MOISAND C, ALVINERIE P, BUTOUR J-L, GUILLEMOT J-C, FERRARA P, MONSARRAT B, MAZARGULL H, VASSART G, PARMENTIER M, COSTENTIN J: Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL-1 receptor. *Nature* 377:532-434, 1995.
101. MILLER-PÉREZ C, BUCIO-PACHECO V, MUCIO-RAMIREZ S, ANTÓN B, LEÓN-OLEA M: Caracterización Anatómica y funcional de la nociceptina-orfanina FQ en los ganglios periesofágicos del caracol *Helix aspersa*. Memorias del XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiol. y XLIII Congreso de la Soc. Mex.de Ciencias Fisiol. Res C96. Cancún, Q. Roo. Méx., 3-7 de septiembre del 2000.
102. MILLER-PÉREZ, C., MENDOZA-SOTELO, J., LEÓN-OLEA, M. Estudio inmunocitoquímico de la Nociceptina/Orfanina FQ en el procrebro del caracol *Helix aspersa*. XVII Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría, México D.F. 28-30 octubre del 2002.
103. MINAMI T, HOSOI Y, TOYA T, KATAO Y, MAEKAWA K, KATSUMATA S, YABUUCHI K, ONOGI T, SATOH M: In situ hybridization of k-opioid receptor mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett* 162:161-164, 1993.
104. MINAMI T, OKUDA-ASHITAKA E, NISHIZAWA M, MORI H, ITO S: Inhibition of nociceptin-induced allodynia in conscious mice by prostaglandin D2. *Br J Pharmacol* 122:605-610, 1997.
105. MITSUMA T, NEBI R, MASATO K, KOSHI A, YUICHI M, TSUYOSHI N, JUNICHI S, JING P, YOSHIFUMI H: Distribution of orphanin FQ in the rat an immunohistochemical study. *Med Sci Res* 26:403-405, 1998.
106. MOGIL J, GRISEL J, BELKNAP J, GRANDY D, REINSCHIED R, CIVELLI O: Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience* 75:333-7, 1996a.
107. MOGIL J, GRISEL J, ZHANGS G, BELKNAP J, GRANDY D: Functional antagonism of mu, delta and kappa-opioid antinociception by orphanin FQ. *Neurosci Lett* 214:131-4, 1996b.
108. MOLLEREAU C, PARMENTIER M, MAILLEUX P, BUTOUR JL, MOISAND C, CHALON P, CAPUT D, VASSART G, MEUNIER JC: ORL-1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning functional expression, and localization. *FESB Lett.* 341:33-38, 1994.
109. MOLLEREAU C, SIMONS M-J, SOULARUES P, LINERS F, VASSARY G, MEUNIER J-C, PARMENTIER M: Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prenociceptin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:8666-8670, 1996.
110. MONTECUCCI P, DE CASTIGLIONE R, PIANI S, GOZZINI L, ERSPAMER V: Amino acid sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res* 17:275-83, 1981.
111. MONTIEL J, CORNILLE F, ROQUES B, NOBLE F: nociceptin/Orphanin FQ metabolism: Role of the aminopeptidase and endopeptidase 24.15. *J. Neurochem.*, 68:354-361, 1997.
112. MOORE M, BLACK P: Neuropeptides. *Neurosurg Rev* 14:97-110, 1991.
113. MORAN T, ABDULLA F, SMITH P: Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides* 21:969-76, 2000.

114. MUCIO-RAMIRÉZ S, MILLER-PÉREZ C, SÁNCHEZ-ISLAS E, LEÓN-OLEA M: El Receptor ORL-1 y su Péptido Endógeno, la Nociceptina/Orfanina FQ. Nuevos Miembros de la Familia de los Opioides. *Salud mental* vol 24 No. 6, 43-54, 2001.
115. MUNEOKA Y, MORISHITA F, FURUKAWA Y, MATSUSHIMA O, KOBAYASHI M, OHTANI M, TAKAHASHI T, IWAKOSHI E, FUJISAWA Y, MINAKATA H: Comparative aspects of invertebrate neuropeptides. *Acta Biol Hung* 51:111-32, 2000.
116. NABESHIMA T, NODA Y, MAMIYA T: The role of nociceptin in cognition. *Brain Res* 848:167-173, 1999.
117. NAIK DR, SAR M, STUMPF WW: Immunochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the lizard, *Anolis carolinensis*. *J. Comp. Neurol.*, 198:583-601, 1981.
118. 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.
119. NEAL CR, MANSOUR A, REINSCHIED R, NOTHACKER H, CIVELLI O, WATSON SJ: Localization of orphanin FQ (Nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *Comp. Neurol.* 368:229-251, 1999.
120. NETTI C, RAPETTI D, SIBILIA V, PAGANI F, PECILE A, GUIDOBONO F: Endocrine effects of centrally injected nociceptin in the rat. *Brain Res.* 938 (1-2):55-61. 2002.
121. NISHI M, TAKESHIMA H, MORI M, NAKAGAWARA K, TAKEUCHI T: Structure and chromosomal mapping for the mouse k-opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C). *Biochem. Biophys Res Commun* 205:1353-57, 1994.
122. NOBLE F, ROQUES B: Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice. *FESB Lett* 401:227-229, 1997.
123. NODA M, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, TOYOSATO M, HIROSE T, INAYAMA S, NAKANISHI S, NUMA S: Cloning and analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295:202-206, 1982.
124. NORTH RA, WILLIAMS J, SUPRENANT A, CHRISTIE MJ: Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:5487-5491, 1987.
125. NOTHACKER P, REINSCHIED K, MANSOUR A, HENNINGSEN A, ARDATI A, MONSMA J, WATSON SJ, CIVELLI O: Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8677-8682, 1996.
126. OKUDA-ASHITAKA E, MINAMI T, TACHIBANA S, YOSHIRO Y, NISHIUCHI Y, KIMURA T, ITO S: Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. *Nature* vol. 392/19: 286-289, 1998.
127. OLSON, G., R. OLSON AND ABBA J. KASTIN: Endogenous opiates: a review. *Peptides*, 17:1421-1466, 1966.
128. OSINSKI M, BROWN RD: Orphanin FQ/Nociceptin: a novel neuromodulator of gastrointestinal function? *Peptides* 27:999-1005, 2000.
129. PAN Y-X, XU J, PASTERNAK G: Cloning and expresión of a cDNA encoding a mouse brain orphanin FQ/nociceptin precursor. *Biochem J* 315:11-13, 1996.
130. PASTERNAK GW, WOOD PJ: Multiple mu opiate receptors. *Life Sci* 26;38(21):1889-98, 1986.
131. PEISER CH, UNDEM B, FISCHER A: Nociceptin effects in the airways. *Peptides* 27:995-998, 2000.
132. PELLICER F, ASAI M, LEÓN-OLEA M, SÁNCHEZ-ALVAREZ M: In vitro release of immunoreactive Met- an Leu-enkephalins in whole periesophageal ganglia of *Helix aspersa* Comp. *Biochem. Physiol.* 104c:323-325. 1993.

133. PERT C, SNYDER S: Opiate receptors: demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011-1014, 1973.
134. QUINGLEY D, McDOUGALL J, DARLAND T, ZHANG G, RONNEKLIEV O, GRANDY D, ALLEN R: Orphanin FQ is the major OFQ¹⁻¹⁷ containing peptide produced in the rodent and monkey hypothalamus. *Peptides* 19:113-139, 1998.
135. REINSCHIED RK, ARDATI A, MONSMA FJ JR, CIVELLI O: Structure-activity relationship studies on the novel neuropeptide orphanin FQ. *J Biol Chem* 271(24):14163-8, 1996.
136. REINSCHIED RK, HIGELIN J, HENNINGSEN RA, MONSMA FJ JR, CIVELLI O: Structures that delineate orphanin FQ and dynorphin A pharmacological selectivities. *J Biol Chem* 273(3):1490-1495, 1998.
137. REINSCHIED RK, NORTHACKER H-P, BUNZOW JR, GRANDY DK, LANGEN H, MONSMA JR, CIVELLI O: Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor. *Science* 220:792-794, 1995.
138. REPETTO M, PADRON A, WILLIAMS H, DEVINE D: Amygdaloid injections of orphanin FQ (OFQ) increase activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Soc Neurosci Abstr.* 24, 590.10, 1999.
139. RIEDL M, SHUSTER S, VULCHANOVA L, WANG J, LOH HH, ELDE R: Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive nerve fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord. *Neuroreport* 31:7(8):1369-72, 1996.
140. ROSSI G, LEVENTHAL L, PASTERNAK G: Naloxone sensitive orphanin FQ-induced analgesia in mice. *Eur J Pharmacol* 311: R7-R8, 1996.
141. RUEGG U, CUENOD S, HILLER J, CIOANNINI T, HOWELLS R, SIMON J: Characterization and partial purification of solubilized active opiate receptor from toad brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:4635-4638, 1981.
142. SAITO Y, MARIYAMA K, SAIDÓ T, KAWASHIMA S: N23K, a gene transiently up-regulated during neural differentiation, encodes a precursor protein for a newly identified neuropeptide nociceptin. *Biochem Biophys Res Commun* 217(2):539-545, 1995.
143. SÁNCHEZ-ISLAS E, SÁNCHEZ-ALVAREZ M, PELLICER F, LEÓN-OLEA M: immunohistochemical localization of enkephalin in the central nervous system of axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Soc. Neurosci. Abs.* 23(1):202.8, 1993.
144. SANDIN J, GEORGIEVA J, SHOTT P, OGREN S, TERENIUS L: Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. *Eur J Neurosci* 9:194-7, 1997.
145. SAUNDERS SE, BURKE JF, BENJAMIN PR: Multimeric CREB-binding sites in the promoter regions of a family of G-protein-coupled receptors related to the vertebrate galanin and nociceptin/orphanin-FQ receptor families. *Eur J Neurosci* 12(7):2345-2353, 2000.
146. SCHULZ S, MATTHIAS S, NUB D, GRAMSCH CH, VOLKER H: Nociceptin/orphanin FQ and opioid peptides show overlapping distribution but not co-localization in pain-modulatory brain regions. *Neuroreport* 7:3021-5, 1996.
147. SHAFFER H: Natural history, ecology, and evolution of the mexican "axolotls". *Axolotl Newsletter*, 18:5-11, 1989.
148. SHAW C: Neuropeptides and their evolution. *Parasitology* 113:s35-45, 1996.
149. SIMANOV R, GOODMAN R, APOSHIAN D, SNYDER S: Phylogenetic distribution of morphin-like "enkephalin". *Brain Res.* 111:204-211, 1976.
150. SIMON E AND HILLER M: The opiate receptors. *Annu Rev Pharmacol* 18:371-394, 1978.
151. SIMON J, BENYTHE S, BORSODI A, SZUCS M, WOLLEMAN M: Separation of k-opioid receptor subtype from frog brain. *FEBS* 183: 395-397, 1985.

152. SIMON J, 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.
153. SIMONDS W: The molecular basis of opioid receptor function. *Endocr Rev* 9:200-12, 1988.
154. SMITH M, SMITH B: Analysis of the literature on the mexican axolotl. Synopsis of the herpetofauna of Mexico. Eric Lundberg, Augusta West Virgini, 1971.
155. SMITH M: Discovery of the axolotl and its early history in biological research. En: Armstrong J, Malacinski G: *Developmental biology of the axolotl*. Oxford University Press, New York, 13-22, 1989.
156. STRAND F: *Neuropeptides: regulators of physiological processes*. MIT Press, London, 1999, 658 pp.
157. TAYLOR F, DICKERSON A: Norciceptin/orphanin FQ. A new opioid, a new analgesic? *Neuroreport* 8:65-70, 1998.
158. TERENIUS L: From opiate pharmacology to opioid peptide physiology. *Ups J Med Sci* 105(1):1-15, 2000.
159. TERENIUS L: Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol* 32:317-320, 1973.
160. THE MERCK INDEX, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12th ed. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. 1996.
161. TIAN J, XU W, ZHANG W, FANG Y, GRISEL J, MOGIL J, GRANDY D JI-SHENG HAN: Involvement of endogenous Orphanin FQ in electroacupuncture-induced analgesia. *Neuroreport* 8(2):497-500, 1997.
162. TIMOTHY D, FUAD A, SMITH P: Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides* 21:969-976, 2000.
163. UEDA H, FUKUSHIMA N, TAKAGI H: A Met-enkephalin releaser (kyotorphin)-induced release of plasma membrane-bound Ca²⁺ from rat brain synaptosomes. *Brain Res* 1;419(1-2):197-200. 1987.
164. UHL GR, CHILDERS S, PASTERNAK G: An opiate-receptor gene family reunion. *Trends in neurosciences* 17:89-93, 1994.
165. VACCARINO A, OLSON G, OLSON R, KASTIN A: Endogenous Opiates:1998. *Peptides* 20:1527-74, 1999.
166. VAUDRY H, JENKS B, OBERBEEKE U: Biosynthesis processing and release of pro-opiomelanocortin relate peptides in the intermediate lobe of the pituitary gland of the frog *Rana ridibunda*. *Peptides* 5:905-912, 1984.
167. WANG JB, JOHNSON PS, IMAI Y, PERSICO AM, OZENBERGER BA, EPPLER CM, UHL GR: cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FESB Lett*. 348:75-79, 1994.
168. WANG JB, JOHNSON PS, IMAI Y, PERSICO AM, OZENBERGER BA, EPPLER CM, UHL GR: Human mu-opiate receptor-cDNA and genomic clones, pharmacological characterization and chromosomal assignment. *FESB Lett*. 338:217-222, 1994.
169. WICK MJ, MINNERATH SR, LIANA X, ELDE R, LAY PY, LOH HH: Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa receptors opioid. *Brain Res Mol Brain Res* 27:37-44. 1994.
170. XU X, HAO J, WIESENFELD H: Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/ nociceptin in the rat. *Neuroreport* 7:2092-2094, 1996.
171. YAKIMOVA K, PIERAU F: nociceptin/Orphanin FQ: effects on thermoregulations in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21(5):345-52, 1999.

172. YAMAMOTO T, NOZAKI-TAKAGUCHI N, SAKASHITA Y, KIMURA S: Nociceptin/orphanin FQ, role in nociceptive information processing. *Prog Neurobiol* 57:527-35, 1999.
173. YANG H, HEXUM T, COSTA E: Opioids in adrenal glands. *Life Sci* 27:1119-1125, 1980.
174. ZACCONE G, FASULO S, AINIS L, MAUCERI A, LICATA A, LAURIANO E: ENKEPHALIN immunoreactivity in the paraneurons of the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) tongue. *Neuropeptides* 28:257-60, 1995.
175. ZADINA JE, HACKLER L, GE L, KASTIN A: A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature*, 386:499-502, 1997.

Abstract View

ANATOMICAL DISTRIBUTION OF NOCICEPTIN/ORPHANIN FQ IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF THE *AMBYSTOMA MEXICANUM*.

S. Mucio-Ramírez¹; C. Miller-Pérez¹; E. Sánchez-Islas¹; B. Anton²; M. Leon-Olea^{1*}

1. Histología y M.E., 2. Neurobiología Molecular, Instituto Nacional de Psiquiatría, México D.F. 14370, Mexico

Recently, a new receptor and its endogenous agonist of the opioid family has been identified: Opioid Receptor Like-1 (ORL-1) and Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ). Both of them are expressed in a similar way in some regions of the CNS. Recent works support the theory that this new system ORL-1/N/OFQ, participates in the modulation of diverse cerebral functions like: nociception, motor, sensorial, cognitive and neuroendocrine processing, as well as memory and learning. All studies to date, have been performed in rat, mouse and rabbit. It is well documented that most of the endogenous opioids are conserved through phylogeny. Therefore, it is relevant to search the existence and the distribution of the N/OFQ in the brain of the amphibians. This work shows the anatomical distribution of the N/OFQ in the CNS of the neotenic axolotl *Ambystoma mexicanum*. We used immunohistochemical techniques with an antibody generated against the c-terminal sequence to N/OFQ and were affinity-purified by chromatography. Intense and moderated immunoreactivity (IR) were found in fibers of the stria-amgdalinea-complex, anterior commissure, habenular area, optic chiasma and medial eminence. Also, groups of 30-50 cell bodies present IR in the olfactory bulb, tectum, hippocampal formation, dorsal thalamus, hypothalamus and adenohypophysis. Isolated IR-neurons were present near blood vessels. This distribution suggests that N/OFQ participates in different cerebral and neurosecretory functions in the *Ambystoma mexicanum* as in rat and mouse.

Supported by: MLO CONACYT 29151-N, IMP-3290



Site Design and Programming © ScholarOne, Inc., 2001. All Rights Reserved. Patent Pending.

EL RECEPTOR ORL-1 Y SU PÉPTIDO ENDÓGENO, LA NOCICEPTINA/ORFANINA FQ. NUEVOS MIEMBROS DE LA FAMILIA DE LOS OPIOIDES

Samuel Mucio-Ramírez,* Carolina Miller-Pérez,* Eduardo Sánchez-Islas,* Martha León-Olea*

SUMMARY

Clonación of opioid receptors δ , μ and κ was followed by identification and sequencing of another member of the opioid family: the opioid receptor like-1 (ORL-1). Although they share similarities with receptors μ , δ and κ , endogenous opioid ligands like β -endorphin, dynorphin A and enkephalins do not have great affinity for this receptor. After the discovery of ORL-1, its endogenous peptide was isolated. This peptide present a nanomolar affinity with its receptor. Two different research groups reported this peptide: Meunier et al. (1995) called it nociceptin, and Reinscheid et al. (1995) called it orphanin FQ. ORL-1 and nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) have a wide anatomical distribution in the nervous system, mainly in the olfactory nucleus, cerebral cortex, hippocampus, septal region, basal ganglia, thalamus, hypothalamus, pons, medulla, cerebral peduncle, spinal cord and retina. This anatomical distribution evidences its role in different cerebral functions. Administration of N/OFQ may have hyperalgesic, allodinic, antiopioid or even analgesic effects. Basically, the effects are both related with dose and administration route. Besides, it may produce many behavioral effects which especially modify locomotion, exploratory behavior, motivation, anxiety, memory, food intake and neuroendocrine modulation. N/OFQ is derived from a protein precursor of high molecular weight called prepronociceptin (PPNOC), which contains only one copy of the aminoacid sequence of N/OFQ. The gene of PPNOC is conserved in five mammals (rat, mouse, porcine, bovine and human species). PPNOC is predominantly expressed in hypothalamus, midbrain, lateral lemniscus, superior olive, trigeminal spinal nucleus of the brainstem and spinal cord. Given the recent discovery of this peptide and its receptor, and the fact that it has a wide localization within the CNS, it is obvious that the study of its physiology and pharmacology is not totally finished. Two evidences—the presence of N/OFQ in species that belong to low levels of phylogenetic scale like mollusk *Helix aspersa*, *H. pomatia* y *Cepaea nemoralis* and the pronociceptive effect, similar to the hyperalgesia in mammals—

support the idea that this new opioid system has an early phylogenetic origin and a functional continuity during the course of evolution.

In this paper we review the literature concerning this new receptor/peptide opioid system ORL-1 and its endogenous peptide nociceptin/orphanin FQ.

Key words: Opioid peptides, opioid receptors, nociceptin, orphanin FQ, ORL-1.

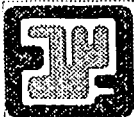
RESUMEN

A la clonación de los receptores opioides δ , μ y κ siguió la identificación y secuenciación de otro miembro de la familia opioide, el receptor ORL-1 (por sus siglas en inglés, *opioid receptor like-1*). No obstante, su gran homología con los receptores μ , δ y κ , los ligandos opioides endógenos, como la β -endorfina, la dinorfina A y las encefalinas, no presentan gran afinidad por este receptor. Después del descubrimiento del ORL-1, se aisló su péptido endógeno; éste tiene gran afinidad (nanomolar) para su receptor. Dos grupos de investigación independientes reportaron con este péptido: el grupo de Meunier lo llamó nociceptina y el grupo de Reinscheid, orfanina FQ. El ORL-1 y la nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) tienen una distribución anatómica amplia en el sistema nervioso, principalmente en los núcleos olfatorios, corteza cerebral, hipocampo, región septal, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, puente, bulbo, pedúnculos cerebrales, médula espinal y retina, lo que evidencia su participación en diversas funciones cerebrales. La administración de la N/OFQ puede producir hiperalgesia, alodinia, efectos antiopioides o analgesia. Estos efectos dependen básicamente de la dosis y de la vía de administración. Además, alteraciones en la locomoción, en el comportamiento exploratorio motivacional, en la ansiedad, memoria, alimentación y modulación neuroendocrina. La N/OFQ se deriva de un precursor de alto peso molecular, la prepronociceptina (PPNOC), el cual contiene una sola copia de la secuencia

*Laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica. Subdirección de Neurociencias. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Calzada México-Xochimilco 101. San Lorenzo Huipulco, 14370, México, D.F. Tel. (5255) 5655-2811 ext. 179. Fax: (5255) 5655-9980.

Correspondencia: doctora Martha León-Olea, e-mail: marthalo@imp.edu.mx

Recibido: 5 de septiembre de 2001. Aceptado: 13 de septiembre de 2001.



FORMATO PARA EL ENVIO DE RESUMENES
XLV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS
(Fecha límite de recepción: 1º de junio del 2002)

INFORMACION DEL PRIMER AUTOR:

Nombre completo:	José Samuel Mucio Ramírez
Departamento:	Laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica, Subdirección de Neurociencias
Institución:	Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente"
Dirección completa (incluye código postal):	Calz. México-Xochimilco #101, Col. San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlálpán, c.p. 14370, México, D.F.
Teléfono:	56-55-28-11 extensión 179
Fax:	56-55-99-80
Email:	mucios@imp.edu.mx

PALABRAS CLAVE DE LAS SESIONES (ver listado):

1. Neurotransmisores y receptores

2. Neuroendocrinología

DISTRIBUCIÓN ANATOMICA DE LA NOCICEPTINA/ ORFANINA FQ, EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL AMBYSTOMA MEXICANUM. Mucio-Ramírez S. *, Miller-Pérez C. *, Sánchez-Islas E. *, Antón B. *, León-Olea M. Lab. de Histología y Microscopía Electrónica, Lab. de Neurobiología Molecular, Inst. Nal. Psi. México D.F.

El receptor ORL-1 (Opioid Receptor Like 1) y su ligando endógeno, la Nociceptina/Orphanina FQ (N/OFQ) son nuevos miembros de la familia de los opioides. Se expresan ampliamente en el Sistema Nervioso Central (CNS). Participan en la modulación de diversas funciones cerebrales como: la nocicepción, funciones motoras, sensoriales, procesos cognoscitivos y neuroendocrinos, así como en la memoria y aprendizaje. Está documentado que los péptidos opioides endógenos están conservados a través de la filogenia. Por lo que, es relevante investigar la existencia y la distribución de la N/OFQ en el cerebro de los anfibios. En este estudio se llevó a cabo la distribución anatómica de la N/OFQ en el CNS del *Ambystoma mexicanum* por medio de técnicas inmuno-histoquímicas. Nuestros resultados mostraron que la inmunoreactividad (IR) a N/OFQ en el cerebro del axolotl, se distribuye principalmente en células y fibras del núcleo estriado-amigdalino, comisura anterior, habénula, quiasma óptico, eminencia media, lóbulo intermedio de la hipófisis y la adenohipófisis. En el hipotálamo, adenohipófisis, tectum, formación hipocámpal, tálamo dorsal y el núcleo olfatorio se encontraron grupos de entre 20 y 30 neuronas con moderada IR. Existen neuronas IR en la periferia de los vasos sanguíneos del hipotálamo y del núcleo estriado. La N/OFQ tiene una distribución amplia en el SNC del *A. mexicanum*, con una localización similar a la reportada en los mamíferos. Esta distribución sugiere que la N/OFQ participa en diferentes funciones cerebrales, hormonales y neurosecretorias en el *A. mexicanum* como las reportadas para la rata y el ratón. Agradecimientos: asistencia técnica de F. Camacho parcialmente financiado por CONACYT-MLO-29150-N