



**IDENTIFICACIÓN DE LA NOCICEPTINA/ORFANINA FQ UN NUEVO
PÉPTIDO DE LA FAMILIA DE LOS OPIOIDES, EN EL GANGLIO
PERIOESOFÁGICO DEL CARACOL, *Helix aspersa*.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
BIÓL. CAROLINA MILLER PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTHA LEÓN OLEA



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.

AGRADECIMIENTOS

Al la dirección de Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

A la Facultad de Medicina al Posgrado de Ciencias Biomédicas de la UNAM.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo para la realización de este proyecto (Clave: 29151N)

A los miembros del jurado y comité tutorial por sus comentarios y sugerencias.

Dra. Martha Maria De La Salud León Olea

Dr. Miguel Pérez de la Mora

Dr. Armando Pérez Torres

Dr. Juan Riesgo Escobar

Dr. Ángel Zarain Herzberg

Dr. Francisco Pellicer Graham

Dra. Maria Luisa Fanjul Peña

DEDICATORIA

Con cariño a mi hijo Herman por que le dio un significado especial a mi vida y por ser la persona que me impulsa a seguir adelante.

A mi madre Rosa Pérez Márquez, a mi tío Juan Pérez Márquez y a mis hermanos Samuel, Lydía y Ricardo por su apoyo y cariño para poder alcanzar mis metas.

A mis amigos Eduardo Sánchez Islas, René Garduño Gutiérrez, Samuel Mucio Ramírez, por su amistad, apoyo y consejos.

A mis compañeros José Mendoza Sotelo por su apoyo en la microscopía electrónica, a Feliciano Camacho García por su colaboración diaria en el laboratorio.

A mis compañeros Juan Carlos Calva, Mariana Leriche y Gilberto Matamoros por sus consejos para la realización de este trabajo.

A la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo y a la Dra. Silvia Cruz Martín del Campo por sus valiosas aportaciones para la tesis.

Con cariño a mi tutora la Dra. Martha León Olea. Por su paciencia y apoyo incondicional para poder desarrollar y alcanzar las metas de esta tesis.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
SUMMARY	9
ANTECEDENTES	13
Precusores de la N/OFQ.....	16
Distribución anatómica de la N/OFQ.....	20
Fisiología de la nociceptina/orfanina FQ.....	21
Nocicepción.....	21
Efecto antiopioide.....	22
Efecto neuromodulador.....	23
Locomoción.....	23
Actividad anti-estrés.....	24
Antagonistas del receptor NOP.....	25
Modelo experimental: <i>Helix aspersa</i>	26
Ganglio Nervioso Periesofágico del caracol, <i>Helix aspersa</i>	27
Neuropéptidos y neurotransmisores en moluscos.....	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
Experimentos Morfológicos.....	34
Disección del ganglio periesofágico del caracol <i>Helix aspersa</i>	35
Fijación.....	35
Características del anticuerpo anti-nociceptina/orfanina FQ.....	35
Immuno Dot.....	36
Inmunohistoquímica.....	37
Controles de Inmunohistoquímica.....	38
Análisis.....	38

Inmunocitoquímica.....	39
Experimentos Conductuales.....	39
Termonocicepción.....	39
Evaluación de la conducta de evitación en la plancha caliente.....	40
Caracterización farmacológica.....	41
Fármacos.....	41
Curvas temporales y dosis- respuesta.....	41
Experimentos de interacción.....	42
<i>N/OFQ más Phe¹ψ o morfina o dinorfina</i>	42
<i>N/OFQ más naloxona</i>	42
<i>Morfina más naloxona</i>	43
<i>Phe¹ψ más morfina o dinorfina</i>	43
Análisis estadístico de los datos.....	43
Experimentos Bioquímicos.....	44
Extracción del péptido.....	44
Trazador.....	44
Curva de titulación y curva estándar.....	45
Radioinmunoanálisis.....	46
RESULTADOS	47
Resultados de inmunodot.....	47
Resultados Morfológicos.....	47
Controles de inmunohistoquímica.....	47
Distribución Anatómica.....	48
Ganglios Cerebroides.....	49
Procerebro.....	49
Mesocerebro.....	50
Postcerebro.....	51
Ganglios Subesofágicos.....	52
Complejo ganglionar viscero-parietal-pleural.....	52
Ganglios Pedales.....	54
Doble marcaje para nociceptina/orfanina FQ y encefalinas.....	57

Resultados Microscopia electrónica.....	59
Procerebro.....	59
Ganglios parietales.....	62
Termonocicepción.....	63
Curvas temporales y dosis respuesta.....	64
N/OFQ y Naloxona.....	64
<i>Phe¹Ψ, Dinorfina A₁₋₁₇ y Morfina</i>	64
Experimentos de interacción.....	68
<i>N/OFQ más Phe¹ Ψ o morfina o dinorfina</i>	68
<i>N/OFQ más naloxona</i>	68
<i>Morfina más naloxona</i>	68
<i>Phe¹Ψ más morfina o dinorfina</i>	70
Radioinmunoanálisis.....	71
Curva de titulación.....	71
DISCUSIÓN	73
Ganglios Cerebroides.....	74
Procerebro.....	74
Mesocerebro.....	76
Postcerebro.....	77
Ganglios Subesofágicos.....	78
Termonocicepción.....	80
Radioinmunoanálisis.....	86
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFIA	91
ANEXO 1	107
ANEXO 2	117

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1.....	15
Figura 1.....	18
Figura 2.....	19
Figura 3.....	27
Figura 4.....	28
Figura 5.....	29
Figura 6.....	30
Figura 7.....	36
Figura 8.....	47
Figura 9.....	48
Figura 10.....	50
Figura 11.....	51
Figura 12.....	53
Figura 13.....	55
Figura 14.....	56
Figura 15.....	57
Figura 16.....	58
Figura 17.....	60
Figura 18.....	61
Figura 19.....	62
Figura 20.....	63
Tabla 2.....	65
Figura 21.....	66
Figura 22.....	67
Figura 23.....	69
Tabla 3.....	71
Figura 24.....	72
Figura 25.....	72

ABREVIATURAS

ABC	avidina biotina peroxidasa
ADN	ácido de desoxirribonucleico
Anti- N/OFQ	anticuerpo anti-nociceptina/orfanina FQ
ASB	albúmina sérica bovina
β-E	beta-endorfina
C	comisura
CPDC	conectivo cerebro pedal
DAB	diaminobenzidina tetrahidroclorinada
Din	dinorfina ¹⁻¹⁷
ED₅₀	dosis efectiva 50
E_{max}	efecto máximo
FIR	fibras inmunorreactivas
FITC	isotiocianato de fluoresceina
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
i.c.v.	intracerebroventricular
I¹²⁵ N/OFQ	nociceptina/orfanina FQ marcada con yodo
IR-N/OFQ	Inmunorreactividad a la nociceptina/orfanina FQ
i.t.	intratecal
LE	leu-encefalina
LP	pedal izquierdo

LPC	procerebro izquierdo
LPTC	postcerebro izquierdo
ME	met-enkefalina
MetOH	metanol
Mor	morfina
ARNm.	ácido ribonucléico mensajero
NaCl	cloruro de sodio
Nal	naloxona
NIR	neuronas aisladas
nNOS	sintasa del óxido nítrico neuronal
Nocist	nocistatina
N/OFQ	nociceptina/orfanina FQ
NOP	nociceptin opioid receptor
NPF	neuropéptido F
PB	amortiguador de fosfatos
PBS	amortiguador de fosfatos salino
PBS-T	amortiguador de fosfatos salino con tritón
PCR	reacción en cadena de polimerasa
Phe¹Ψ	[Phe ¹ Ψ(CH ₂ NH)Gly ²]nociceptin(1-13)NH ₂
POMC	preproomielanocortina
PPNOC	prepronociceptina
RIA	radioinmunoanálisis
RMC	mesocerebro derecho
RP	pedal derecho

rpl	pleural derecho
rpr	parietal derecho
SNB	suero normal de burro
SNC	suero normal de cabra
SP	sustancia P
t.a.	temperatura ambiente
TBS	Tris amortiguador salino
TRITC	Tetrametil rodamina
T-20	Tween 20
V	visceral
VIP	péptido intestinal vasoactivo

RESUMEN

El neuropéptido nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) y su receptor (nociceptin opioid receptor) NOP forman parte de la familia de los opioides y se distribuyen ampliamente en el sistema nervioso de los mamíferos. Esta distribución amplia sugirió su participación en diferentes funciones cerebrales. En el sistema algésico la N/OFQ puede tener un efecto hiperalgésico, alodinia, un efecto antiopioide y un efecto analgésico dependiendo de la dosis, la vía de administración y el modelo experimental utilizado. La N/OFQ modula la liberación de diferentes neurotransmisores y hormonas, participa en funciones como la locomoción, el aprendizaje y la memoria, entre otras. La N/OFQ se deriva de un precursor de alto peso molecular llamado prepronociceptina (PPNOC), el cual se aisló de rata, humano, bovino y ratón.

En el molusco *Cepaea nemoralis* reportaron que después de una inyección de N/OFQ (10 ng/20 µl) en el hemocele, presentan un efecto pronociceptivo al ser evaluados en la prueba de la plancha caliente. Este efecto pronociceptivo se puede comparar con la hiperalgesia de los mamíferos.

El primer antagonista sintético que se describió para el receptor NOP fue el pseudopéptido [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]nociceptin(1-13)NH₂ (Phe¹Ψ), se describió como un antagonista competitivo del receptor NOP. Mas tarde, se demostró en otros modelos experimentales que el Phe¹Ψ puede actuar como agonista o como un agonista parcial del receptor NOP. El receptor NOP y su ligando endógeno la N/OFQ se consideran miembros de la familia de los opioides.

Hay evidencia de que el sistema regulatorio neuropeptidérgico está conservado a través de la filogenia. Sin embargo no existen estudios que describan la existencia de la N/OFQ en especies con sistemas menos complejos estructuralmente como son los moluscos. Por lo que es posible, postular la existencia de la N/OFQ en el sistema nervioso de especies como los moluscos y en particular en los ganglios nerviosos del caracol de jardín *Helix aspersa*.

El interés de este estudio fue demostrar la existencia y describir la distribución anatómica de la inmunorreactividad de este péptido en los ganglios nerviosos periesofágicos del caracol de jardín, *Helix aspersa*. Además, estudiar el efecto de la N/OFQ sobre la termnocicepción en este caracol, mediante el empleo de la prueba de la plancha caliente, así como, cuantificar el contenido tisular de N/OFQ por medio del radioinmunoanálisis en estos ganglios.

Mediante el empleo de anticuerpos específicos para la N/OFQ, se cuantificó y describió la distribución anatómica, celular y tisular de este péptido bioactivo en los ganglios nerviosos periesofágicos del caracol, *Helix aspersa*. También se determinó el efecto de la N/OFQ sobre la termnocicepción del caracol evaluado en la plancha caliente. Para poder determinar lo anterior se realizaron técnicas de inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, radioinmunoanálisis y una prueba de termnocicepción (prueba de la plancha caliente). Con esta prueba estudiamos el efecto de la N/OFQ, el pseudopéptido la Phe¹Ψ, la morfina, dinorfina y naloxona sobre la termnocicepción del caracol. Se elaboraron curvas dosis respuesta de estos fármacos y se estudió el efecto de las combinaciones de estos fármacos sobre la termnocicepción.

Los resultados comprueban la existencia de inmunorreactividad a este neuropéptido y muestran una amplia distribución de la N/OFQ en todos los ganglios periesofágicos del caracol *Helix aspersa*. La distribución anatómica de la inmunorreactividad a N/OFQ se encontró en neuronas de diversos tamaños, aisladas y en grupos. En fibras gruesas y delgadas en el neuropilo de los ganglios, en todos los nervios y en el tejido conectivo periganglionar. En los ganglios cerebroides, en el procerebro describimos una cadena de neuronas inmunorreactivas pequeñas en la región dorsolateral con características morfológicas de ser neuroendocrinas. En las que estudiamos la distribución subcelular de la N/OFQ. Por su amplia distribución anatómica, en los ganglios periesofágicos del *Helix aspersa*, la N/OFQ puede estar involucrada en varias funciones como la olfacción, la regulación neuroendocrina y la reproducción entre otras.

En las pruebas de termnocicepción demostramos que la administración de N/OFQ en el hemocele del caracol (10 y 30 ng/g) y probado en la plancha caliente a 45 °C tiene un efecto pronociceptivo. Este efecto es similar al observado en rata y en el caracol *Cepaea nemoralis*. Este modelo animal nos permitió comparar la potencia y eficacia de los diferentes fármacos estudiados. En el análisis de las curvas dosis-respuesta ajustadas se demostró que la N/OFQ y la naloxona producen un efecto dosis dependiente similar, pero la N/OFQ llega antes a su efecto máximo y es aproximadamente 30 veces más potente que la naloxona; que el efecto antinociceptivo dosis dependiente de la Phe¹Ψ, la dinorfina A₁₋₁₇ y la morfina, tienen una eficacia similar pero la Phe¹Ψ presenta su efecto máximo más rápidamente y su efecto es más prolongado que la dinorfina A₁₋₁₇ o la morfina. En relación a su potencia la Phe¹Ψ es

aproximadamente 50 veces menos potente que la dinorfina A₁₋₁₇, pero 30 veces más potente que la morfina.

En los experimentos de interacción la administración combinada de dosis bajas de Phe¹Ψ y morfina o dinorfina A₁₋₁₇ produce un efecto potente antinociceptivo. Las dosis subefectivas de naloxona y N/OFQ sinergizan para producir pronocicepción. Con la combinación de N/OFQ más Phe¹Ψ se obtuvo una disminución del efecto pronociceptivo de la N/OFQ y una disminución en el efecto antinociceptivo de la Phe¹Ψ. La combinación de la naloxona y la morfina produce una disminución del efecto antinociceptivo de la morfina similar a lo reportado en mamíferos. Los experimentos de interacción sugieren que estas dos clases de opioides participan de manera importante en la regulación del estado nociceptivo del caracol a través de un sistema paralelo, ya que los opioides clásicos no se unen al receptor NOP, ni la N/OFQ se une a los receptores opioides.

En la cuantificación de la N/OFQ de los ganglios nerviosos periesofágicos del *Helix aspersa* se obtuvo una inmunorreactividad de 2.4 ± 0.1937 pmol/g en ganglios cerebroides y de 5.4 ± 1.5619 pmol/g en ganglios subesofágicos. La comparación de la concentración de N/OFQ con la de encefalinas en extractos y liberada de los ganglios del caracol, encontramos que es similar a la de Met-encefalina y menor a la de Leu-encefalina.

La existencia de inmunorreactividad a N/OFQ, su distribución anatómica amplia, su efecto sobre la termonocicepción, y su concentración en los ganglios nerviosos periesofágicos del caracol *Helix aspersa*, sugieren que este péptido tiene una función importante dentro de la fisiología del caracol. En esta tesis demostramos que juega un

papel importante en la modulación de la termonocicepción, similar a lo reportado en *Cepaea nemoralis* y en los mamíferos. Por lo que el caracol *Helix aspersa* resulta un modelo idóneo para el estudio de diversos procesos fisiológicos, bioquímicos, farmacológicos, morfológicos y evolutivos, que pueden contribuir a esclarecer las funciones en las que este péptido participa tanto en este modelo animal como en otras especies.

SUMMARY

The neuropeptide nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) and its receptor NOP (nociception opioid receptor) are part of the opioid family and are widely distributed in the mammalian nervous system; this broad distribution suggests their participation in diverse brain functions. In the algescic system, N/OFQ may have the following effects: hyperalgesia, allodynia, anti-opioidergic effect, analgesia, where its repercussion depends on the dose, route of administration and experimental model used. N/OFQ modulates the release of different neurotransmitters and hormones; it participates in functions such as locomotion, learning, and memory, among others. N/OFQ is derived from a high molecular weight precursor called prepronociceptin (PPNOC) which has been isolated in rat, human, bovine and mouse.

In the snail *Cepea nemoralis*, an injection into the hemocoel cavity causes a pronociceptive effect demonstrated in the hot plate assay. This effect can be compared to hyperalgesia in mammals.

The first synthetic antagonist described for NOP was the pseudopeptide [Phe¹Ψ(CH₂NH) Gly²]-nocicpetin(1-13)-NH₂ or Phe¹Ψ. It was initially described as a competitive antagonist of the NOP receptor. Later on, in other experimental models, Phe¹Ψ was found to act as an agonist or partial agonist of the NOP receptor. Currently, as mentioned before, the NOP receptor and its endogenous ligand N/OFQ are considered members of the opioid family.

There is evidence suggesting that the neuropeptidergic regulatory system has been conserved through phylogeny. However, studies describing the existence of N/OFQ in structurally less complex systems such as molluscs are lacking. Yet it is

feasible to postulate the existence of N/OFQ in the nervous systems such as molluscs; in our case in the neural ganglia of the land snail *Helix aspersa*.

The aim of this study was to demonstrate the presence, as well as the anatomic distribution of N/OFQ, in the perioesophageal ganglia of the snail *H. aspersa* using an immunohistochemical approach. In addition, we studied the effect of N/OFQ on thermonociception in this snail by using the hot plate paradigm. Finally, to quantify N/OFQ in the molluscan nervous tissue a radioimmunoanalysis of the ganglia was performed.

Antibodies specific for N/OFQ were used not only to quantify this bioactive neuropeptide, but also to describe its anatomical, cellular and tissue distribution in the perioesophageal ganglia of the snail *Helix aspersa*. To carry out these determinations, immunohistochemical, immunocytochemical and radioimmunoanalysis methods were undertaken. Besides, the effect of N/OFQ on snail thermonociception was assayed in the hot plate test. This assay also helped us to analyze the effect of N/OFQ, pseudopeptide Phe¹Ψ, morphine, dynorphin and naloxone on snail thermonociception. Dose response curves of these compounds were elaborated. In addition, the effect of the combined administration of these agents on thermonociception was studied as well.

Our results corroborate the existence of immunoreactivity to N/OFQ together with its broad distribution in the perioesophageal ganglia of *H. aspersa*. The anatomical distribution of the immunoreactivity was encountered in neurons of various sizes, isolated and in clusters; in thick and thin fibers in the neuropile of these ganglia; in all nerves, and in the periganglionar connective tissue. In the procerebrum of the cerebral ganglia, we described a chain of small immunoreactive neurons with the morphological characteristics of neuroendocrine cells in the dorsolateral region. In this cellular group,

the N/OFQ distribution was analyzed at subcellular level. Given the wide anatomical distribution of N/OFQ in perioesophageal ganglia of this snail, this suggests the involvement of this peptide in various functions such as olfaction, neuroendocrine regulation and reproduction, to mention a few.

In the nociceptive trials, we demonstrated that N/OFQ administration into the hemocoel cavity of the snail (10 ng/g and 30 ng/g) and the subsequent test in the hot plate assay at 45°C caused a pronociceptive effect, similar to that reported in rat and *C. nemoralis*. In our animal model it was possible to establish a comparison of the potency and efficacy of the different drugs analyzed in this study. The analysis of the adjusted dose-response curves showed that N/OFQ and naloxone produce a similar dose dependent effect, but N/OFQ reaches its peak before and is approximately 30-fold more potent than naloxone. The dose dependent antinociceptive effect of Phe¹Ψ, dynorphin A₁₋₁₇ and morphine is similar, but Phe¹Ψ presents its peak more rapidly and its effect lasts longer than dynorphin A₁₋₁₇ and morphine. The potency of Phe¹Ψ is 50 times stronger than dynorphin A₁₋₁₇, and 30 times more potent than morphine.

With regard to drug interaction, the combined administration of Phe¹Ψ with morphine or dynorphin A₁₋₁₇ at low doses yielded a more potent antinociceptive effect. Sub-effective doses of naloxone and N/OFQ synergized to produce pronociception. The combination of N/OFQ and Phe¹Ψ rendered a diminution in the pronociceptive effect of N/OFQ and a reduction in the antinociceptive effect of Phe¹Ψ. The combination of naloxone and morphine yielded a decrease in the antinociception of morphine coincident to that reported in mammals. Interaction experiments suggest that these two types of opioids have a relevant participation in the regulation of the nociceptive state in the snail

through a parallel system, since classic opioids do not bind to the NOP receptor nor N/OFQ to opioid receptors.

Quantification of the immunoreactivity to N/OFQ in the perioesophageal ganglia of *Helix aspersa* was 2.4 ± 0.1937 pmol/g in cerebral ganglia and 5.4 ± 1.5619 pmol/g in suboesophageal ganglia. When N/OFQ concentrations were compared with those of enkephalin extracts released by snail ganglia, we found that they were similar to met-enkephalin levels, but lower than those of leu-enkephalin.

The existence of immunoreactivity to N/OFQ, the anatomical distribution of this peptide, the effect on thermoreception and its concentration in the perioesophageal ganglia of *H. aspersa* provide evidence suggesting that N/OFQ plays a crucial role in the physiology of the snail. In this thesis we have demonstrated that this peptide plays a role in the modulation of thermoreception as has been reported in *Cepea nemoralis* and in mammals. Therefore, *Helix aspersa* is an ideal model to study physiological, biochemical, pharmacological, morphological and evolutionary processes that may contribute to elucidate the diverse roles N/OFQ plays not only in this animal model but also in other species.

ANTECEDENTES

Los péptidos opioides están presentes en diferentes especies a lo largo de la escala filogenética (Naiki et al., 1981; Ninkowic et al., 1981; Leroith et al., 1982; León et al., 1987; 1991; 1993; 1994; Pellicer et al., 1993; Vaccarino et al., 1999). Están involucrados en diferentes funciones del sistema nervioso entre ellas, la regulación de varios aspectos de la nocicepción en vertebrados e invertebrados (Kavaliers, 1988a; Kavaliers, 1988b). Los opioides actúan a través de tres subtipos de receptores opioides llamados mu, delta y kappa, los cuales muestran una alta afinidad a la morfina, las encefalinas, los benzomorfanos y dinorfinas, respectivamente (Simonds, 1988). Los receptores opioides son proteínas membranales acopladas a proteínas Gi/Go que al unirse a sus agonistas inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y disminuye la permeabilidad al calcio extracelular, a la vez que aumentan la permeabilidad extracelular del potasio (North et al., 1987). Así, la administración aguda de opioides produce una hiperpolarización que da como resultado una reducción significativa de la liberación de neurotransmisores. Esto explica los efectos inhibitorios de los opioides (Di Chiara y North, 1992).

Uno de los hallazgos importantes de los últimos años en el campo de los opioides fue el aislamiento y la caracterización molecular del subtipo delta de receptor opioide (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992). Posteriormente, se caracterizaron los subtipos mu y kappa, mediante el empleo de técnicas de recombinación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en estudios de clonación por homología. Con estas mismas estrategias, diversos grupos de trabajo (Uhl et al., 1994; Meunier et al., 1995) posteriormente lograron identificar y caracterizar

un nuevo receptor miembro de la familia opioide, el ORL-1 (por sus siglas en ingles: Opioid Receptor-Like-1) o NOP (nociceptin opioid receptor). Este receptor se aisló del tejido nervioso de varios mamíferos tales como la rata, el ratón y el humano. El análisis de su estructura muestra que se encuentra altamente conservado en estas especies de mamíferos, ya que hay un 95% de homología en la secuencia de aminoácidos en los dominios transmembranales entre el humano y la rata (Meunier et al., 1995; Meunier, 1997). La homología estructural del receptor NOP con la de los receptores opioides delta, mu y kappa también es alta en los dominios peptídicos hidrofóbicos transmembranales (63-65%), pero muy divergente a nivel de los dominios amino y carboxilo terminales (Meunier et al., 1995). Este perfil de homología sugirió que el receptor NOP poseía mecanismos de señalamiento intracelular similares a los empleados por los otros miembros de receptores de la familia opioide. Los reportes experimentales confirmaron esta hipótesis de acoplamiento funcional intracelular del receptor NOP en neuronas del sistema nervioso central de la rata (Grandy, 1996; Connor et al., 1996; Pan y Hirakawa, 2000). El receptor NOP se describió por varios grupos de investigación y recibió diversos nombres que se mencionan en la tabla 1.

La distribución anatómica del receptor NOP muestra que se expresa en casi todas las regiones del SNC de la rata, particularmente en las áreas corticales y corticolímbicas (amígdala, hipocampo, habénula, septum), además de substancia 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 et al., 1994). Estos estudios se llevaron a cabo por medio de hibridación *in situ* del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que lo codifica (Mollereau et al., 1994; Fukuda et al.,

1994; Bunzow et al., 1994; Neal et al., 1999) y por inmunohistoquímica (Antón et al., 1996).

TABLA 1.

Nombres que se le han dado al receptor NOP

	Animal	Referencia
LC132	Rata	Bunzow et al., 1994.
ROR-C	Rata	Fukuda et al., 1994.
Oprl	Rata	Chen et al., 1994.
C3	Rata	Lachowicz et al., 1995.
XOR1	Rata	Wang et al., 1994.
MOR-C	Ratón	Nishi et al., 1994.
Hyp 8-1	Humano	Wick et al., 1994.
ORL-1	Humano Cerdo	Mollereau et al., 1994. Osinsky et al., 2000.

La distribución neuroanatómica del receptor NOP sugiere su participación en la modulación de una amplia gama de funciones cerebrales, tales como el procesamiento motor, sensorial, cognoscitivo, neuroendocrino, el aprendizaje y la memoria. El NOP se localiza también en el intestino, músculo esquelético, conducto deferente y baso de rata (Wang et al., 1994) así como, en linfocitos humanos (Wick et al., 1994). Esto último sugiere que puede tener un papel en las funciones del sistema inmune.

Dos grupos de investigación lograron identificar y aislar molecularmente de extractos crudos de cerebro de rata (Meunier et al., 1995) y de cerdo (Reinscheid et al., 1995), un péptido endógeno que se une con alta afinidad al receptor NOP, ($K_d \sim 0.1\text{nM}$; Meunier et al., 1995) y es un potente agonista de este receptor ($ED_{50} \sim 1\text{ nM}$; Butour et al., 1998). Este péptido, 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 A₁₋₁₇ (**YGGFLRRIRPKLKWDNQ**), sin embargo no se une con alta afinidad a ninguno de los receptores opioides (Mogil et al., 1996 a y b; Rossi et al., 1996; Calo et al., 2000).

El efecto de la N/OFQ depende de la dosis y de la vía de administración. Esta puede producir hiperalgésia, alodinia, analgésia y un efecto antiopioide. La administración de N/OFQ en los sujetos experimentales provoca modificaciones en las conductas locomotora, exploratoria, motivacional, ansiedad, memoria, ingesta de alimentos y en la homeostasis (Meunier et al., 1995; Florin y col., 1996, Rossi et al., 1996; Mamiya et al., 1998; Yamamoto et al., 1999; Lufty y Maidment., 2000; Krowicki y Kapusta., 2006).

Precursos de la N/OFQ.

La N/OFQ deriva de un precursor de alto peso molecular, llamado prepronociceptina (PPNOC). Este se aisló de rata, humano, bovino y ratón (Mollereau et al., 1996; Nothacker et al., 1996). La PPNOC es una proteína que contiene 176 aminoácidos en el humano y el bovino, 181 en rata y 187 en ratón (Mollereau et al., 1996). El gen de la PPNOC se ha conservado altamente en las tres especies y tiene una organización similar al de los genes de los opioides, lo que sugiere que estos genes tienen un origen evolutivo común (Mollereau et al., 1994; Meunier et al., 1995; Houtani et al., 1996; Nothacker et al., 1996, Danielson y Dores 1999; Pan et al., 2000) (Fig. 1).

Los péptidos opioides clásicos provienen de 3 proteínas precursoras de alto peso molecular que son: la proopiomelanocortina (POMC) (Nakanishi et al., 1979), la proencefalina A (Comb et al., 1982; Noda et al., 1982) y la prodinorfina o proencefalina

B (Kakidani et al., 1982). Estas proteínas precursoras contienen entre 209 y 267 aminoácidos y un peso molecular cercano a los 30 000 daltones.

El gen de la PPNOG se localiza en la región 8p21 del cromosoma 8 del humano (Mollereau et al., 1996; Houtani et al., 1996). Saito y colaboradores (1995) clonaron este precursor a partir de células de neuroblastoma, codificado por el gen N23K. La PPNOG 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 et al., 1998; Darland et al., 1998; Mollerau et al., 1996; Calo et al., 2000). Para el procesamiento de la nociceptina intervienen las enzimas amino-peptidasa N y la endopeptidasa 24.15 (Montiel et al., 1997). La secuencia de la nociceptina está flanqueada por los pares de aminoácido básicos lisina y arginina, donde actúan dichas enzimas (Montiel et al., 1997; Calo et al., 2000) (Fig. 1). Estos sitios dan origen a diversos péptidos bioactivos que no se unen al NOP y tienen efectos diferentes a la N/OFQ. En la región carboxilo terminal de la N/OFQ, esta flanqueada por el péptido bPNP-4 y el bPNP-5 (Costentin et al., 1998). En la región amino-terminal la N/OFQ está flanqueada por un péptido de 41 aminoácidos del cual se origina otro heptadecapéptido, la nocistatina (bPNP3), que tiene un efecto antagónico sobre la hiperalgesia y la alodinia inducidas por la N/OFQ.

La nocistatina está conservada en humanos, bovinos y murinos (Okuda-Ashitaka et al., 1998; Costentin et al., 1998). El análisis de la secuencia del gen de la PPNOG 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 et al., 1994; Nothacker et al., 1996; Danielson y Dores 1999). Por medio del análisis de Northern blot se vio que el gen de la PPNOG se transcribe

predominantemente en amígdala, núcleos subtalámicos, hipotálamo, sustancia negra y tálamo (Nothacker et al., 1996; Houtani et al., 1996) (Fig.2)

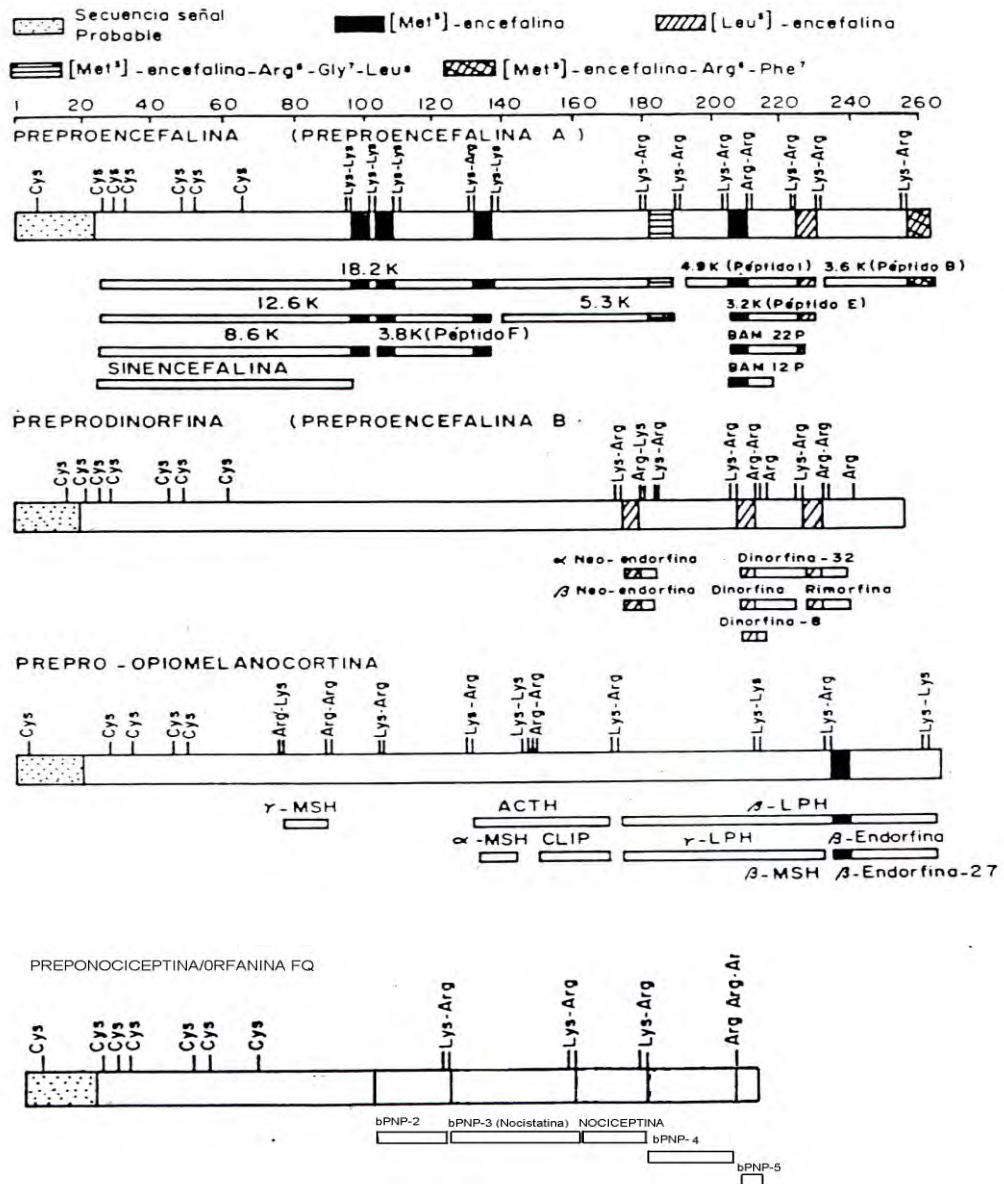


Figura 1.

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

Péptido señal		
	┌──────────────────┐	
Bovino	MKILFCDLLLLSLFSSVSSSCQKDCLVCREKLRPTLDSFSLEMCILECEEKAFTSPLWTP	60
Humano	MKVLLCDLLLLSLFSSVFSSCQRDCLTCQEKLHPALDSFDLEVCILECEEKVFPSPPLWTP	60
Ratón	MKILFCDVLLLLSLLSSVFSSCPRDCLTCQEKLHPAPDSFNLKTCILQCEEKVFPRLWTV	60
Rata	MKILFCDVLLLLSLLSSVFSSCPEDCLTCQERLHPAPGSFNLKLCILQCEEKVFPRLWTL	60
bPNP-2		
	┌──────────────────┐	
Bovino	CTKVMARGSWQLSPADPDHVAALDQPRASEMQHL KRM PRVRS LF QRQ----- K	109
Humano	CTKVMARSSWQ LSPAAPAHVAAALYQPRASEMQHL RR MPRVRS LF QEQ----- E	109
Ratón	CTKVMASGSGQLSPADPELVSA ALYQP KASEMQHL KRM PRVRS LV QVRDAEPGADAEPGA	120
Rata	CTKAMASDSEQ LSPADPELT SAA LYQSKASEMQHL KRM PRVRS VV QARDAEPEA-----	114
	┌──────────┐ ┌──────────┐ ┌──────────┐	
	bPNP-3 (Nocistatina) Noc/OFQ bPNP-4	
Bovino	R TEPGLEEVGE I EQKQ LQ KR FGGFTGARKSARKLANQ KR FSEFMRQYLVL SMQSSQRRRT	169
Humano	EPEPGMEEAGEMEQLQ KR FGGFTGARKSARKLANQ KR FSEFMRQYLVL SMQSSQRRRT	169
Ratón	DAEPGADDAEEV EQKQLQ KR FGGFTGARKSARKLANQ KR FSEFMRQYLVL SMQSSQRRRT	180
Rata	DAEPVADEADEVE QKQLQ KR FGGFTGARKSARKLANQ KR FSEFMRQYLVL SMQSSQRRRT	174
bPNP-5		
	┌──────────┐	
Bovino	LHQNGNA 176	
Humano	LHQNGNV 176	
Ratón	LHQNGNV 187	
Rata	LHQNGNV 181	

Figura 2.

Alineación de las secuencias de aminoácidos de la PPN/OFQ de bovino, humano, ratón y rata. Los aminoácidos conservados están en azul, los aminoácidos de ruptura probable en negritas y el péptido señal y los péptidos que se liberan están indicados con líneas (Modificado de Okuda-Ashitaka et al., 1998).

La nocistatina está conservada en humanos, bovinos y murinos (Okuda-Ashitaka et al., 1998; Costentin et al., 1998). El análisis de la secuencia del gen de la PPNOOC 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 et al., 1994; Nothacker et al., 1996; Danielson y Dores 1999). Por medio del análisis de Northern blot se vio que el gen de la PPNOOC se transcribe

predominantemente en amígdala, núcleos subtalámicos, hipotálamo, sustancia negra y tálamo (Nothacker et al., 1996; Houtani et al., 1996) (Fig.2)

Distribución anatómica de la N/OFQ

La N/OFQ tiene una distribución anatómica amplia en el SNC de la rata (Mitsuma et al., 1998; Neal et al., 1999). En el cerebro la inmunorreactividad a N/OFQ (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, retina y cíngulo anterior (Riedl et al., 1996; Schulz et al., 1996; Mitsuma et al., 1998; Leff et al., 1999, Sim-Selley et al., 2003). 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 et al., 1996; Schulz et al., 1996). La IR-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 et al., 1996). Varias regiones cerebrales y de la médula espinal contienen también otros péptidos opioides. Sin embargo, en estudios hechos con microscopía confocal y utilizando doble marcaje se encontró que no existe colocalización de los péptidos opioides y la N/OFQ, con pocas excepciones, como en algunas fibras y terminales nerviosas (Schulz et al., 1996). Neal y colaboradores (1999) compararon la localización de la IR-N/OFQ y la expresión del ARNm de la PPNOC y demostraron que correlacionan en todas las áreas del SNC de la rata estudiadas. También se identificó la N/OFQ en extractos de hipotálamo de mono usando técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y se detectaron múltiples picos de

inmunorreactividad, el pico más alto se co-eluyó con el péptido sintético N/OFQ (Quingley et al., 1998).

Fisiología de la nociceptina/orfanina FQ

La nociceptina, como los péptidos opioides, participa en varios sistemas biológicos como son la nocicepción, neurosecreción, la regulación hormonal, entre otros. Su efecto a nivel celular es como modulador inhibitorio. En este estudio analizaremos su relación con el sistema algésico, por lo que se describirán con más detalle estas funciones.

Nocicepción

Los efectos de la administración de N/OFQ sobre la nocicepción son contradictorios y dependen básicamente de la dosis, la vía de administración y la especie animal. La administración intracerebroventricular (i.c.v.) de N/OFQ en ratones produce una respuesta pronociceptiva en la prueba de la plancha caliente (Meunier et al., 1995) y en pruebas de presión de la cola (Rinscheid et al., 1995). La aplicación de N/OFQ por vía intra tecal (i.t.) produce analgesia (Grisel et al., 1996; Xu et al., 1996; 1998; Dawson-Basoa et al., 1997; Tian et al., 1997). Por otro lado, Vanderah et al., (1998) reportaron que no hay un efecto nociceptivo significativo dosis dependiente cuando se aplican inyecciones i.t. e i.c.v. de N/OFQ a dosis que van desde 0.055 a 10 nM en ratas que fueron evaluados en la prueba de plancha caliente, la presión de la cola o calor por radiación. Rossi y colaboradores (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 es revertido por la naloxona (Rossi et al., 1998). No hay una evidencia clara de un mecanismo exacto de acción de los efectos pro o antinociceptivos. Los autores sugieren que la N/OFQ puede interactuar con uno o más tipos de receptores (Rossi et al., 1996) o juega un papel en la modulación opioide (Mogil et al., 1996 a,b., Gintzler et al., 1997; Di Giannuario et al., 1999). Por otro lado, Kavaliers y Perrot-Sinal (1996) observaron que después de una inyección de N/OFQ (10 ng/20 μ l) en el hemocele, del molusco *Cepaea nemoralis* se presenta un efecto pronociceptivo al ser evaluados en la prueba de la plancha caliente. Este efecto pronociceptivo es similar a la hiperalgesia de los mamíferos.

Efecto antiopioide

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. a dosis de 0.1 a 10.0 nM revierte los efectos analgésicos inducidos por electroacupuntura de manera dosis dependiente, de manera similar a la reversión de los efectos analgésicos inducidos por morfina (Tian et al., 1997; ver revisión Darland et al., 1998, Chen et al., 2007; Ge et al., 2007). La tolerancia y dependencia a la morfina puede atenuarse o revertirse por antagonistas o agonistas del NOP (Jhamadas et al., 1998; Ge et al., 2007).

Efecto Neuromodulador

La administración de N/OFQ vía i.c.v, a dosis 10 nM, 15 minutos después de la aplicación de la morfina, reduce significativamente la liberación de dopamina en el núcleo acumbens en estudios de microdiálisis, lo cual evidencia el papel modulador de la N/OFQ en este núcleo cerebral (Murphy et al., 1996; Di Giannuario et al., 1999). A partir de estudios realizados en sinaptosomas, se reportó que la N/OFQ modula la liberación de serotonina y noradrenalina en la neocorteza de la rata (Marti et al., 2003). Otra de las posibles funciones moduladoras de la N/OFQ es sobre la liberación de Met-enkefalina (ME), ya que a dosis bajas de N/OFQ (1-10 nM) inhibe la liberación de Met-enkefalina, mientras que a dosis altas (100-1000 nM) produce un incremento en la liberación de Met-enkefalina en el plexo mientérico de cobayo (Gintzler et al., 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 et al., 1995; Noble y Roques, 1997). Florin y colaboradores (1996), con dosis menores (5-50 pM), pudieron inhibir o estimular la actividad locomotora y la conducta exploratoria en ratones. Estos efectos no son sensibles a naloxona pero son revertidos por antagonistas dopaminérgicos D₁ y D₂, lo que sugiere que estos efectos pueden estar ocasionados por un incremento en la transmisión dopaminérgica. Con dosis de 10 a 100 nM de N/OFQ vía i.c.v. se produce una pronunciada depresión locomotora que incluye pérdida de la coordinación, del balance y del tono muscular en ratas. La tolerancia a estos efectos se desarrolla rápidamente dentro de los 2 ó 3 días de tratamiento y permanece durante aproximadamente 7 días después de la última inyección de N/OFQ

(Devine et al., 1996; Stratford et al., 1997). Sandin y colaboradores (1997), administraron N/OFQ (10 nM) directamente en hipocampo y reportaron una disminución en el tiempo de presentación de la conducta exploratoria con aumento en la locomoción en respuesta a estímulos nuevos. El efecto depresor de la locomoción parece ser específicamente supraespinal ya que cuando las ratas reciben dosis entre 0.5-10 nM de N/OFQ vía i.t. no presentan ninguna alteración locomotora (Xu et al., 1996; Tian et al., 1997). Nishi y colaboradores (1994), sugieren que la N/OFQ no tiene un efecto tónico sobre la locomoción, ya que los ratones que carecen del gen del receptor NOP no presentan anormalidades en el comportamiento locomotor.

En el músculo liso, la N/OFQ actúa como un neuromodulador de la motilidad gastrointestinal, estimulando la actividad contráctil del músculo longitudinal del estómago, pero sin alterar las contracciones del colon proximal. Además, la NOFQ inhibe la liberación de acetilcolina en el estómago e íleon de ratas pero no en el colon proximal (Osinski y Brown 2000). La N/OFQ revierte la contracción del músculo liso de la tráquea del cobayo (Peiser et al., 2000).

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, prueba de laberinto, privación de alimento, etc., (Jenck et al., 1997; 2000; Griebel et al., 1999; Le Maitre et al., 2006). El grupo de Kôster (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 modulando la respuesta ante estímulos dañinos (Kôster et al., 1999; Griebel et al., 1999; Uchiyama et al., 2008).

A nivel cardiovascular, la administración de N/OFQ produce vasodilatación, hipotensión y bradicardia (Champion y Kadowitz., 1997; Giuliani et al., 1996; Kapusta et al., 1997; 2005); a nivel renal se observaron cambios en las funciones excretoras renales, como diuresis y antinatriuresis (Kapusta et al., 1997; Krowicki y Kapusta., 2006; Burmeister et al., 2008). También participa en aspectos de memoria y aprendizaje (Sandin et al., 1997, Noda et al., 2000, Roozendaal et al., 2007; Hiramatsu et al., 2008).

Antagonistas del receptor NOP

El primer antagonista sintético que se describió fue el pseudopéptido [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]nociceptin(1-13)NH₂ (Phe¹Ψ) descrito por el grupo de Guerrini (1998) como un antagonista competitivo del receptor NOP. Mas tarde, se demostró en otros modelos experimentales que el Phe¹Ψ puede actuar como agonista o como un agonista parcial del receptor NOP (Chu et al., 1999; Olanas et al., 1999). Otro compuesto desarrollado es el [Nphe¹]-NC(1-13)-NH₂, que actúa como un antagonista competitivo bloqueando la respuesta nociceptiva y el efecto hiperalgésico de la N/OFQ en experimentos de compresión mecánica de la cola de la rata (tail flick) en dosis de 1, 3 y 10 μM i.c.v. (Calo et al., 2000; Hashimoto et al., 2000; Calo et al., 2000). Se han descrito hasta el momento otros antagonistas como el [Nphe¹Arg¹⁴Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂(UFP-101) que tiene poca susceptibilidad a las peptidasas (Calo et al., 2002). Los hexapeptidos acetilados Ac-RYYRIK-NH₂ y Ac-RYYRWKNH₂, presentan un antagonismo potente, sin embargo pueden funcionar como agonistas parciales o

agonistas en diferentes sistemas (Kapusta et al., 2005, Gunduz et al., 2007). Otro compuesto sintetizado es la ZP-120 (Ac RYYRWKKKKKK-NH₂), que actúa como un agonista parcial y presenta una potencia y duración mas prolongada que la N/OFQ (Rizzi et al., 2002; Kapusta et al., 2005).

Modelo experimental: *Helix aspersa*

El *Helix aspersa* (También llamado *Cantareus aspersus*) es un invertebrado que pertenece al phylum mollusca y a la clase Gastropoda. Comprende a los caracoles marinos y terrestres. Se caracteriza por tener una sola concha como univalvo. El caracol de tierra se ha adaptado para sobrevivir fuera del agua. La cavidad del manto funciona como un pulmón modificado y el oxígeno difunde a través de la delgada membrana que tapiza la cavidad. Este recubrimiento debe mantenerse húmedo para el intercambio gaseoso. El pie es el órgano que le permite la locomoción. Se localiza en la parte inferior y esta compuesto de músculo y cubierto por una piel que contiene gran cantidad de glándulas que secretan una sustancia viscosa que mantiene la humedad del animal y facilitan su desplazamiento (Fig. 3).

El caracol *H. aspersa* por sus características anatómicas y fisiológicas, se ha utilizado en diversos estudios científicos relevantes, ya que es un sistema menos complejo. En este se pueden reproducir muchos de los aspectos fisiológicos reportados en mamíferos, encontrándose repuestas similares en algunos casos.

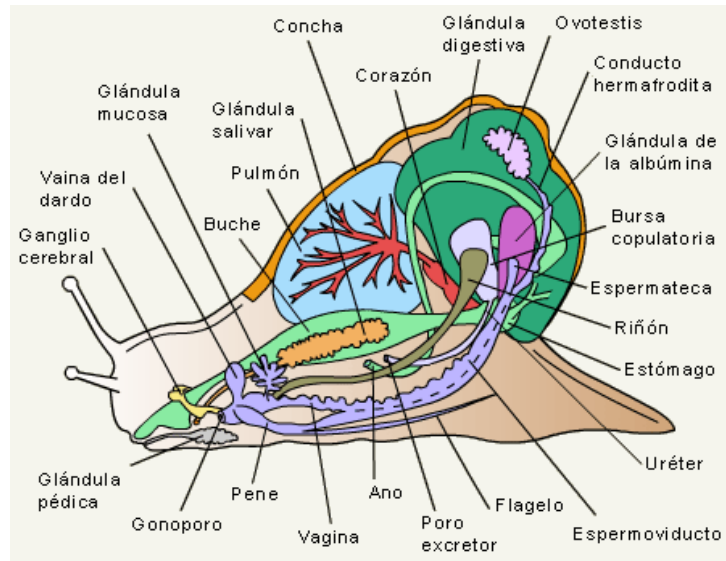


Figura 3.

Esquema del caracol de tierra *Helix aspersa* que muestra sus principales características anatómicas (Modificado de Barnes., 1987).

Ganglio Nervioso Periesofágico del Caracol, *Helix aspersa*

El sistema nervioso central de *H. aspersa* está formado por los ganglios bucales y los periesofágicos. Los ganglios nerviosos periesofágicos están compuestos por pares de ganglios que rodean el esófago a modo de un collar. Por arriba del esófago se encuentran los ganglios cerebroides, y por debajo los subesofágicos. De estos ganglios parten nervios que inervan a los órganos de los sentidos, boca, pie y vísceras (Fig. 4).

La periferia de los ganglios está ocupada por somas de neuronas unipolares o pseudomonopolares. En el interior del ganglio, se encuentra el neurópilo que está lleno de procesos entrelazados de fibras nerviosas. Un número considerable de fibras parte de los cuerpos celulares de la capa cortical, otras fibras neurales de los somas que están en otros ganglios y otras más son fibras de neuronas sensoriales, en los que sus somas están cerca de los receptores (Bullock et al., 1965; Kerkut et al., 1975; Zakharov et al., 1995).

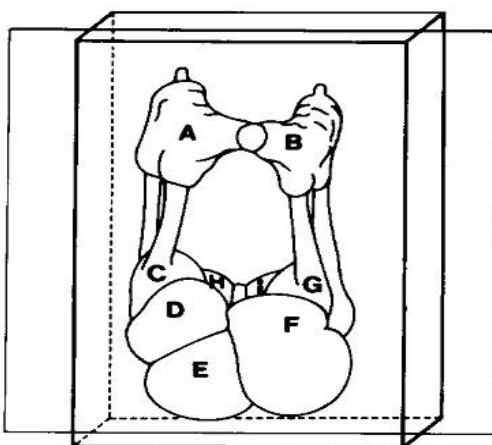


Figura 4.

Esquema del Ganglio nervioso periesofágico del caracol *Helix aspersa*, (A y B) ganglios cerebroides izquierdo y derecho; (H y I) ganglios pedales izquierdo y derecho; (C y G) ganglios pleurales izquierdo y derecho; (D y F) ganglios parietales izquierdo y derecho; (E) ganglio visceral. Se muestra también el plano de los cortes para el proceso histológico (Modificada de Kerkut et al., 1975).

Las conexiones sinápticas tienen lugar dentro del neuropilo. Los procesos ramificados permiten múltiples conexiones y contribuyen a la complejidad del circuito. Una sola interneurona puede tener conexiones con los neuropilos de varios ganglios y puede recibir y distribuir impulsos en numerosas uniones sinápticas (Kerkut et al., 1975).

Los ganglios cerebroides derecho e izquierdo se subdividen en procerebro, mesocerebro y postcerebro. El procerebro se encarga de la percepción sensorial olfatoria y probablemente del aprendizaje olfativo (Chase y Ratte., 1997; 2000; Gelperin, 1990; 1994). El mesocerebro está formado por un grupo de neuronas medianas localizadas en la región dorsomedial de los ganglios cerebroides. Su función se relaciona con el comportamiento de apareamiento (cortejo y copulación) y control de la espermatogénesis (Gomot y Gomot., 1995, Li y Chase., 1995). El metacerebro o

postcerebro recibe información sensorial de los órganos sensoriales anteriores y comanda una respuesta motora apropiada a las señales que recibe, como escape o alimentación (Gelperin y Tank., 1990, Sakharov et al., 1993, Gelperin., 1994; Li y Chase., 1995; Chase., 2000). También hay neuronas que mandan sus axones a los nervios tentaculares y se encargan de la retracción del tentáculo (Chase., 2000) (Fig. 5).

Los ganglios subesofágicos son: dos pleurales derecho e izquierdo, dos parietales derecho e izquierdo, dos pedales derecho e izquierdo y un visceral. Los ganglios pedales inervan el pie y están involucrados en la locomoción (Fig. 6). El pie

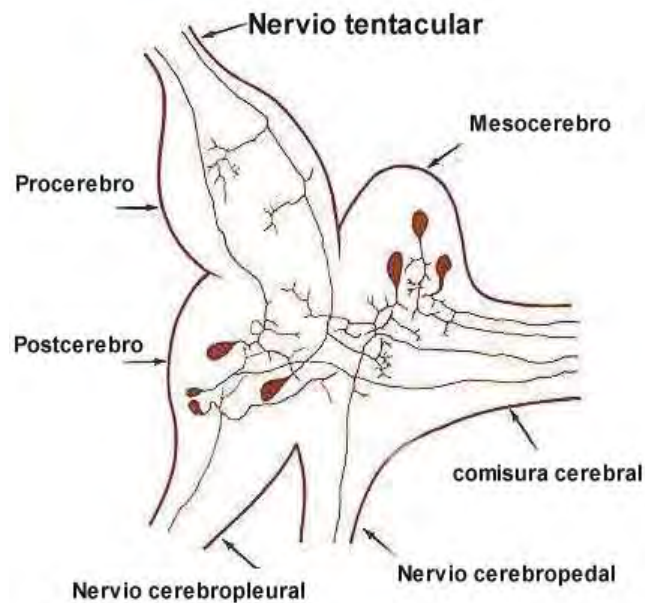


Figura 5.

Esquema del ganglio cerebroide izquierdo del caracol, en el cual se muestra su estructura y algunas de sus neuronas (Modificado de Hanstrom, 1925).

tiene un plexo extenso de fibras y células nerviosas capaces de la recepción, intermediación y comando motor aparentemente autónomo aunque normalmente bajo el

control de los ganglios pedales e indirectamente de los ganglios cerebrales. Posee un plexo subepitelial que incluye no solamente células sensitivas y axones, sino también células ganglionares.

Los ganglios parietales derecho e izquierdo forman un complejo ganglionar con el ganglio visceral y los pleurales llamado complejo pleuro parieto visceral. Hernadi (2000) reportó que las neuronas que se localizan en el ganglio parietal derecho del caracol *Lymnaea stagnalis* son las responsables del cierre del pneumostoma y la contracción de la musculatura para la alimentación. Del ganglio visceral salen los nervios anal e intestinal.

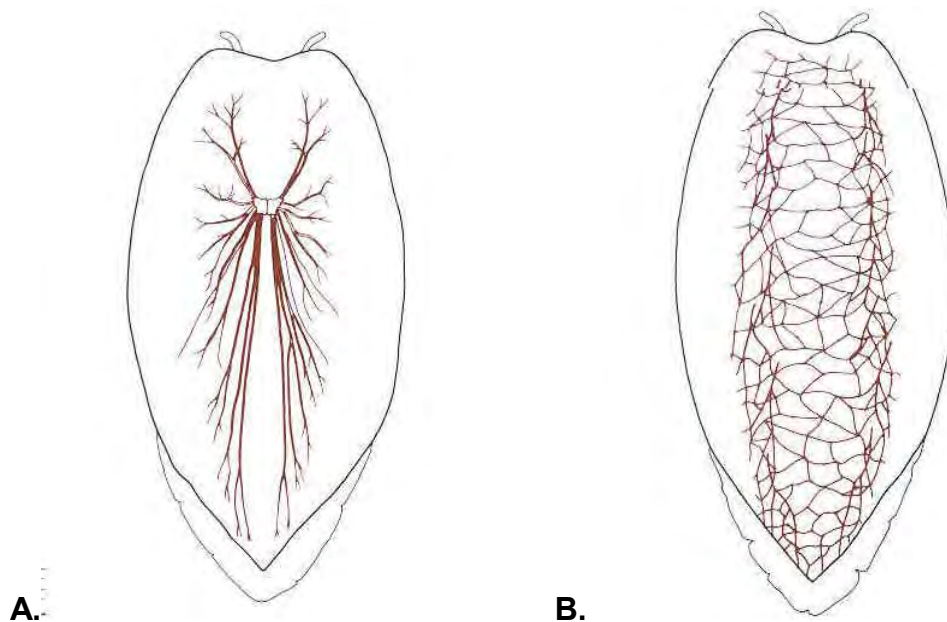


Figura 6.

- A.** Esquema de los ganglios pedales y los nervios pedales principales, vista inferior.
- B.** plexo nervioso del pie del caracol (Modificada de Schmalz, 1914).

Neuropéptidos y neurotransmisores en moluscos

La existencia de neuropéptidos y neurotransmisores en el sistema nervioso de los invertebrados se ha reportado ampliamente. (León et al., 1987, 1993; 1994; Dyakonova et al., 1995, Hernadi y Elekes., 1999; Hernádi, 2000).

En los ganglios periesofágicos del caracol se identificó la presencia de neuropéptidos como Met-encefalina (ME), Leu-encefalinas (LE), FMRFamida, péptido intestinal vasoactivo (VIP), neuropéptido F (NPF) y neurotransmisores como la dopamina, GABA y serotonina (León et al., 1987, 1993; 1994; Kavaliers, 1988 a y b; Elekes y Nassel, 1990; Leung et al., 1994; Dyakonova et al., 1995; Kaufmann et al., 1995; Nezlin y Voronezhskaya., 1997; Hernadi et al., 1998; Hernádi, 2000; Santama y Benjamín, 2000). La hormona de crecimiento, la cual controla el crecimiento en los animales jóvenes, esta relacionada con el comportamiento de apareamiento (cortejo y copulación) y regula la multiplicación espermática en el adulto (Wijdenes et al., 1987; Gomot y Gomot., 1995).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La nociceptina/orfanina FQ y su receptor NOP son considerados miembros de la familia de los opioides. Hay múltiples evidencias de que el sistema regulatorio neuropeptidérgico está conservado a través de la filogenia. Sin embargo, no existen estudios que describan la existencia de la nociceptina/orfanina FQ en especies con sistemas menos complejos filogenéticamente como son los moluscos. Dada la importancia de la filogenia en los procesos de la nocicepción, el interés de este estudio es demostrar la existencia y describir la distribución anatómica de la inmunorreactividad de este péptido en los ganglios nerviosos periesofágicos del caracol de jardín, *Helix aspersa*. El papel fisiológico de la nociceptina/orfanina FQ parece ser en sentido opuesto a la analgesia producida por los péptidos opioides clásicos, como se ha reportado en roedores y en el molusco *Cepaea nemoralis*, por lo que resulta interesante estudiar el efecto de la N/OFQ sobre la termonocicepción en *H. aspersa* mediante el empleo de la prueba de la plancha caliente.

HIPÓTESIS

Hay evidencias de que el sistema regulatorio neuropeptidérgico está conservado a través de la filogenia, por lo que se postula la existencia de la nociceptina/orfanina FQ en el sistema nervioso de especies como los moluscos y en especial en los ganglios nerviosos del caracol de jardín *H. aspersa*.

La administración de nociceptina/orfanina FQ sintética en este caracol participará en la respuesta termonociceptiva.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Mediante el empleo de anticuerpos específicos para la nociceptina/orfanina FQ, cuantificar y describir la distribución anatómica, celular y tisular de este péptido bioactivo en los ganglios nerviosos periesofágicos del caracol, *H. aspersa* y probar si la aplicación de este péptido sintético en el caracol tiene un efecto sobre la termonocicepción evaluado en la plancha caliente.

Objetivos Específicos:

1. Verificar la existencia y distribución anatómica de la inmunorreactividad a nociceptina/orfanina FQ, por medio de técnicas inmunohistoquímicas.
2. Describir la localización subcelular de este péptido por medio de técnicas de inmunocitoquímica para microscopía electrónica.
3. Evaluar el efecto de la nociceptina/orfanina FQ sobre la termonocicepción en el *H. aspersa* en la prueba de la plancha caliente.
4. Determinar el contenido tisular de material inmunorreactivo a nociceptina/orfanina FQ de extractos crudos de péptido total en el tejido nervioso del *H. aspersa*, por medio de un radioinmunoensayo (RIA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron caracoles adultos de *H. aspersa* (también llamados *Cantareus aspersus*) colectados en los jardines de la ciudad de México, los cuales se mantuvieron en condiciones de laboratorio. Se mantuvieron en cajas de acrílico con 10 cm de tierra y humedad del 100% con ciclos de 12/12 h luz/oscuridad, a una temperatura ambiente de 20 ± 2 °C. Los animales se hidrataron diariamente y se alimentaron con lechuga *ad libitum*. Los caracoles se mantuvieron en estas condiciones por lo menos una semana antes de iniciar los experimentos. Los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos de la comisión de ética del Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente.

Para el estudio del péptido opioide N/OFQ en los ganglios periesofágicos del caracol *Helix aspersa* se llevaron a cabo experimentos morfológicos, conductuales y bioquímicos.

Experimentos Morfológicos.

Se determinó la existencia y localización de la N/OFQ en los ganglios del anillo periesofágico del caracol *H. aspersa* con técnicas inmunohistoquímicas de inmunoperoxidasa y de inmunofluorescencia. El tejido así tratado se analizó en un microscopio de campo claro y fluorescencia (Leitz Laborlux 12 o Olympus BX51). También se llevaron a cabo experimentos de doble marcaje para determinar la probable coexistencia o colocación de la N/OFQ con las encefalinas y se analizaron en un microscopio confocal (Zeiss LSM 510 META).

Disección de los ganglios periesofágicos del caracol *Helix aspersa*.

Con una tijera roma se liberó al caracol de su concha; se fijó en una placa de poliestireno; se realizó una incisión en la línea media de la parte dorsal, se separó la piel y se expuso el ganglio; se cortaron los nervios uno a uno hasta extraer el anillo ganglionar.

Fijación.

Los ganglios se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% solo o más ácido pícrico 0.2 % en amortiguador de fosfato salino 0.1M, pH 7.4. (PBS) durante la noche (12 h). Posteriormente, se crioprotegieron en una solución de sacarosa al 30% en PBS. Se realizaron cortes coronales y parasagitales seriados de entre 15 y 20 μm en un criostato a una temperatura de -18 a -22 $^{\circ}\text{C}$ y se montaron en portaobjetos previamente gelatinados.

Características del anticuerpo anti-nociceptina/orfanina FQ

Utilizamos anticuerpos policlonales desarrollados por el Dr. Benito Antón (Lab. de Neurobiología Molecular del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente). El antisuero se generó en conejos Nueva Zelanda (C1-C6) a los que se les inmunizó con el péptido N/OFQ 1-17 acoplado a la proteína KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin; Sigma) siguiendo los protocolos estándares de inmunización. (Harlow y Lane, 1988). La identificación de la especificidad del antisuero a la N/OFQ sintética se llevó a cabo por el método de ELISA (por sus siglas en inglés enzyme-linked immunosorbent assay, Hockfield et al., 1993). Los antisueros se purificaron por afinidad de antígeno (A-APA por sus siglas en inglés Antigen Affinity-Purified Antisera) en una columna de

cromatografía (Harlow y Lane, 1988). Se verificó su especificidad por el método de ELISA e inmunodot-blot (Gutiérrez et al., 2001 para el Ac C1, Fig. 7). Para esta tesis se utilizaron los antisueros C1 y C5, los dos se purificaron por afinidad y se comprobó su especificidad por medio de un inmunodot-blot.

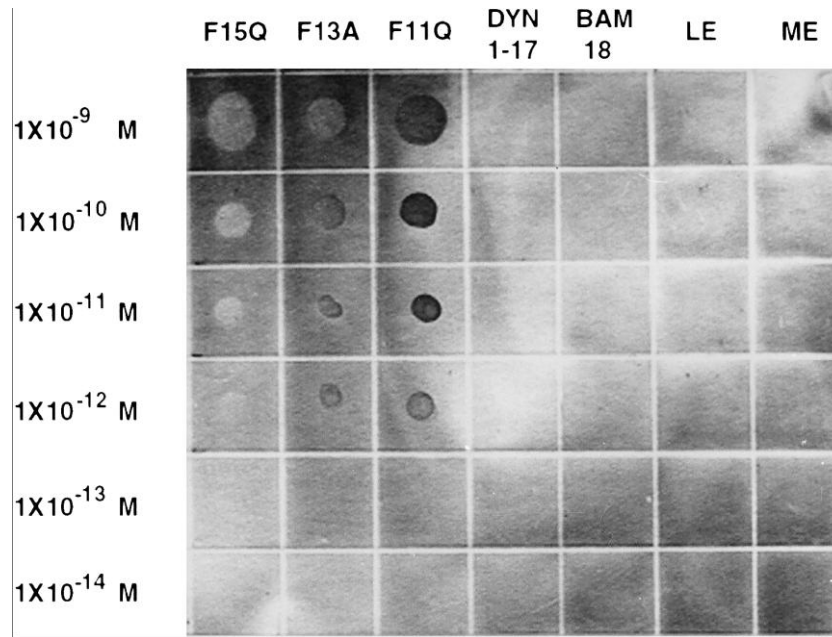


Figura 7.

Immunodot-blot para la sensibilidad y especificidad del anticuerpo anti-nociceptina C1 (F-15-Q). La concentración de cada péptido está en la columna del lado izquierdo a diferentes diluciones (1×10^{-9} a 1×10^{-14}). Los péptidos utilizados fueron. F-15-Q, F-13-A y F-11-Q, dinorfina ₁₋₁₇, BAM-18; LE, Leu-encefalina y ME- Met-encefalina. (Tomado de Gutierrez., et al, 2001).

Immuno Dot

Para determinar la especificidad de los anticuerpos anti N/OFQ que utilizamos en las técnicas de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica en nuestras condiciones experimentales, realizamos un inmuno dot para los anticuerpos C1 y C5. En el inmuno dot se usaron concentraciones diferentes de los péptidos opioides Leu-encefalina, Met-

encefalina, beta-endorfina, N/OFQ y la sustancia P para descartar inmunorreactividad cruzada con los anticuerpos de N/OFQ. Los anticuerpos primarios se incubaron en membranas PVDF, se utilizó un anticuerpo secundario HRP-burro anti conejo (Jackson Immuno Research Lab. INC. West Grove Pennsylvania), y se reveló con complejo de quimioluminiscencia (Perkin Elmer), en una placa radiográfica con una película Kodak X-Omat ultrasensible. (ver metodología detallada anexo 1. pág.107).

Inmunohistoquímica

Se utilizó la técnica de avidina-biotina-peroxidasa (ABC de los Laboratorios Vector Burlingame, CA, USA) o la de inmunofluorescencia indirecta de Coons (1954), para comprobar si con las dos técnicas se marcaban las mismas neuronas y fibras. Las dos técnicas ABC y fluorescencia se siguieron con algunas modificaciones (ver metodología detallada en el anexo Pág. 108 y 110). Para las dos técnicas se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos salina 0.1 M, pH 7.4 con tritón X-100 al 0.3% (PBS-T), como solución de lavado. Para diluir los diferentes anticuerpos y como solución de bloqueo de los sitios de unión inespecífica se utilizó una solución de albúmina sérica bovina 5 % (ASB), suero normal de burro 5 % (SNB) y PBS-T. Se bloqueó durante una hora, después del bloqueo se incubó con alguno de los anticuerpos siguientes: anti-N/OFQ (C1 1:10, C5 1:150); anti-dinorfina A₁₋₁₇ (Peninsula lab, INC. Belmont C.A. USA, 1:50); anti-encefalinas (1: 50 Chemicon Int. CA, USA) por 48 h a 4°C. Los anticuerpos secundarios fueron: burro-anti-conejo ó burro anti-ratón, dependiendo del primer anticuerpo utilizado, conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) o a tetrametil rodamina (TRITC, Jackson Immuno Research Lab. INC. West Grove Pennsylvania) a una dilución 1:50 en solución de bloqueo y se incubaron por dos horas a 37 °C. Como

medio de montaje en el caso de la peroxidasa se utilizó resina Entelan (Merck Darmstadt Germany) y para la Inmunofluorescencia con un medio de montaje que no permite el decaimiento de la fluorescencia (antifade Molecular Probes).

Controles de Inmunohistoquímica

Se realizaron diferentes controles: a) omisión del primer anticuerpo, b) omisión del segundo anticuerpo, c) preadsorción del primer anticuerpo con un exceso (10^{-4} M) de su péptido sintético específico, preadsorción del anticuerpo con diferentes péptidos como Met-enkefalina, β -endorfina y dinorfina (Peninsula lab, INC. Belmont CA., USA), d) control PBS para valorar la fluorescencia nativa. Las estructuras en las que no se observó inmunorreactividad después de realizar la preadsorción del primer anticuerpo con su péptido sintético específico se consideraron específicamente inmunorreactivas.

Análisis

Los cortes seriados de cada ganglio se analizaron en un microscopio Leitz Laborlux 12 o en un Olympus BX51 de campo claro o fluorescencia con los filtros específicos para FITC y TRITC. Se determinó la localización de las neuronas y las fibras inmunorreactivas (NIR y FIR) a N/OFQ. Se realizaron esquemas y se tomaron fotografías con una cámara digital Spot2, (Diagnostic Instruments). A las fotografías se les corrigió únicamente la brillantez /oscuridad.

Inmunocitoquímica

Para determinar la localización de la N/OFQ a nivel subcelular se realizó la técnica de inmunocitoquímica postinclusión para microscopía electrónica. Después de la disección y fijación, se realizaron cortes gruesos (100 µm) del ganglio en un vibratomo (Serie 1000 plus Sectioning System), se osmificaron con tetraóxido de osmio al 1% y se deshidrataron en alcoholes graduales y óxido de propileno, para su inclusión en plano con la resina Epon Araldita (Electrón Microscopy Sciences Hatfield, PA USA). De la rebanada incluida en plano, se obtuvieron cortes de las regiones de interés (ganglios cerebroides, parietales etc.) y de estas se hicieron cortes semifinos y finos (90-100 nm) y se montaron en rejillas de níquel de un solo orificio cubiertas previamente con formvar. Para la inmunocitoquímica se utilizaron los anticuerpos primarios anti-N/OFQ (C1 y C5) y el anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado con oro de 15nm (Amersham Biosciences Argentina SA). Se contrastó con acetato de uranilo (Baltec) y citrato de plomo (Merck). (Ver metodología detallada en anexo pág. 111).

Experimentos Conductuales

Termonocicepción

Para caracterizar el efecto de la N/OFQ sobre la nocicepción en el caracol *H. aspersa* se realizó la prueba de la “plancha caliente”, que en el caso del caracol *H. aspersa* consistió en colocar al caracol en la superficie de la plancha caliente (Socrel, modelo D537) y se cuantificó la latencia o tiempo que tardó el caracol desde que se puso en la superficie de la plancha hasta que presenta la conducta de evitación

(withdrawal behaviour) ante el estímulo térmico. Esta conducta consistió en la elevación de la parte anterior del pie y la retracción de la cabeza hacia la concha.

Evaluación de la conducta de evitación en la plancha caliente

Se llevaron a cabo experimentos preliminares para determinar la temperatura de la plancha en la cual los caracoles presentaban la conducta de evitación y las características de esta conducta de una manera constante y cuantificable bajo nuestras condiciones de laboratorio. La conducta de evitación en los caracoles de tierra se describió como la elevación de la porción anterior del pie totalmente extendido, hasta que sea realmente discernible la elevación máxima (Kavaliers et al., 1988a). En las condiciones de nuestro laboratorio los caracoles presentaron además de la elevación del pie una retracción de la cabeza dentro de la concha. Esta fue una respuesta más clara y constante que la sola determinación de la elevación del pie, por lo que la retracción se consideró como el punto final de la respuesta de evitación (Fig. 20).

Se utilizaron grupos de 10 caracoles ($n=10$) para cada temperatura (38 a $45 \pm 0.5^\circ\text{C}$). Cada caracol se probó una sola vez para descartar una posible liberación de opioides endógenos u otra sustancia que interviniera en el efecto de la N/OFQ. El tiempo de corte fue establecido a los 30 s. A ese tiempo no se produjo ningún daño tisular. Estos experimentos preliminares mostraron que con una temperatura de la plancha de $45 \pm 0.5^\circ\text{C}$, los caracoles presentaron una latencia control de entre 5 y 7 s. Con base en estos resultados se pudo valorar el efecto pronociceptivo (acortamiento de la latencia) como el antinociceptivo (alargamiento de la latencia).

Caracterización farmacológica

Para la caracterización de los diferentes compuestos se llevaron a cabo cursos temporales y dosis respuesta de los diferentes compuestos. Con los valores de las latencias se construyeron las curvas temporales y dosis-respuesta para cada fármaco.

Fármacos

Los fármacos utilizados en este estudio fueron: N/OFQ de 1 a 30 ng/g (Phoenix Pharmaceuticals, INC., Belmont, CA; U.S.A.); el pseudopéptido antagonista del receptor NOP, [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]nociceptin(1-13)-NH₂ de 30 a 560 ng/g (Phoenix Pharmaceuticals, INC., Belmont, U.S.A.); naloxona de 30 a 3000 ng/g (Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A.); dinorfina A₁₋₁₇ de 1 a 5.6 ng/g (Peninsula Lab, INC., Belmont, U.S.A.); morfina de 1000 a 10,000 ng/g (Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A.).

Curvas temporales y dosis- respuesta

Los compuestos se diluyeron en solución salina al 0.9% y se inyectaron en la cavidad del hemocele, atravesando el músculo del pie, en un volumen de 20 µl, con una microjeringa (Hamilton). Para la selección de las dosis se tomó en cuenta los experimentos reportados en rata, ratón y en el caracol *Cepaea nemoralis* (Kavaliers y Perrot-Sinal, 1996; Kavaliers 1988a, b; Guerrini et al, 1998). Los grupos control (n=10 para cada tiempo) fueron naïve (sin tratamiento) y vehículo (inyectados con 20 µl de solución salina).

Para las curvas temporales se administró el fármaco en el tiempo cero (t=0) en grupos independientes de caracoles (n=10), los cuales se probaron en la plancha

caliente a los 15, 30, 60, 90 y 120 min post-inyección. Las curvas temporales se construyeron con el tiempo en el cual se presentó la respuesta máxima.

Experimentos de interacción

N/OFQ más Phe¹Ψ o morfina o dinorfina

En estos experimentos se administró la N/OFQ (10 ng) y Phe¹Ψ (560 ng/g), o morfina (10,000 ng/g), o dinorfina A₁₋₁₇ (5.6 ng/g). Las dosis utilizadas en este experimento fueron las que tuvieron un efecto máximo de acuerdo con las curvas dosis respuesta. La primera combinación fue con Phe¹Ψ, se inyectó en el t=0 y a los 15 min se administró la N/OFQ. Los caracoles se probaron en la plancha caliente a los 45 min después de la última inyección, tiempo en el que los dos compuestos presentan su máximo efecto. En la segunda combinación, se inyectó 10,000 ng/g de morfina y 30 minutos más tarde 10 ng/g de N/OFQ, los caracoles se probaron en la plancha caliente 30 min después. En la tercera combinación se les administro dinorfina A₁₋₁₇ (5.6 ng/g), 30 minutos más tarde N/OFQ (10 ng/g). Se probaron en la plancha caliente 30 minutos después.

N/OFQ más naloxona

Se administraron dosis sub-efectivas de naloxona (100 ng/g) y N/OFQ (1 ng/g) en el t=0, los caracoles se probaron en la plancha caliente a los 30 min post-inyección, tiempo en el que tuvieron su efecto máximo ambos compuestos.

Morfina más naloxona

Para la realización de estos experimentos se administraron simultáneamente dosis de naloxona (1000 ng/g) y morfina (10 000 ng/g) al t=0 y se probaron a los 30 y 60 minutos postinyección.

Phe¹Ψ más morfina o dinorfina

En estos experimentos se administraron dosis sub-efectivas de morfina 1000 ng/g al t=0 y Phe¹Ψ (100 ng/g) 15 min más tarde, o de dinorfina A₁₋₁₇ (1 ng/g) administrada al t=0 y Phe¹Ψ (100 ng/g) a t=15. En los dos experimentos los caracoles se probaron a los 60 min, después de la primera inyección, tiempo en el cual ambos compuestos tuvieron su máximo efecto.

Análisis estadístico de los datos

Los valores se expresaron como el promedio ± el error estándar de los grupos de 10 caracoles. Las latencias de cada grupo se compararon con un análisis de varianza Kruskal-Wallis y una prueba de Tukey (*p<0.05).

El área bajo la curva de cada curso temporal se calculó por la fórmula para trapecoides (Gibaldi, 1991). Para ajustar las curvas dosis respuesta se utilizó el programa Win-nonlin (Pharsight, Co. Version 2.1), para calcular los valores de ED₅₀, y los límites de confianza del 95%. El programa usado para la estadística fue el Sigma Stat 3.1. Las gráficas se hicieron con el software Sigma Plot versión 10 (Jandel Scientific).

Experimentos Bioquímicos.

La cuantificación de la N/OFQ en los ganglios cerebroides y subesofágicos del caracol *H. aspersa* constó de los siguientes procedimientos: extracción del péptido; marcaje del trazador con I^{125} utilizando la técnica de cloramina T; curva de titulación para el anticuerpo; curva estándar y radioinmunoensayo.

Extracción del péptido.

Los ganglios nerviosos periesofágicos de los caracoles *Helix aspersa* se extrajeron e inmediatamente se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se utilizó un método estándar para extraer péptidos opioides del tejido nervioso (Maidment et al., 1989). El tejido se homogenizó con un politrón en 5 volúmenes/gramo de tejido húmedo con una solución de ácido clorhídrico 0.1N a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se obtuvo el extracto de péptido total del sobrenadante a través de centrifugación del homogenado a 12 000 rpm x g por 60 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La solución de HCl se removió de la fracción de péptido crudo por evaporación. El extracto de péptido crudo se resuspendió en buffer fosfatos. El sobrenadante se pasó por una columna de amberlita (preactivada con HCl 0.1N) de 5 ml. La fracción obtenida de 5 ml se eluyó en 30 ml de metanol al 100%, y se evaporó la solución. El residuo peptídico se resuspendió en buffer de fosfatos al 0.1M.

Trazador

El trazador empleado para el RIA fue un péptido sintético, estructuralmente análogo a la N/OFQ (YGGFTGARKSARKLANQ) el cual tiene sustituida por tirosina la fenilalanina inicial del extremo amino terminal (Phoenix Pharmaceuticals, INC., Belmont, CA; U.S.A). Este péptido se marco con I^{125} en la tirosina mediante el empleo del

método de la cloramina T descrito por Hockfield y colaboradores (1993). El péptido marcado con I^{125} se purificó en una columna de amberlita (preactivada con HCl 0.1N).

Curva de titulación y curva estándar.

Se llevo a cabo un RIA en fase sólida con base en el método para péptidos opioides (Maidment et al., 1989). Las muestras se prepararon de los extractos de péptido total crudo en una solución de RIA (0.15 M fosfato de potasio 0.1%, gelatina 0.2 %, Tween-20, pH 7.4). Para el RIA en fase sólida se emplearon platos de 96 pozos removibles (Immunolon II, Dynatech). Los pozos se recubrieron con 0.30 μ g de proteína A en 10 ml de 0.1 M de bicarbonato de sodio por pozo. Después de un período de incubación de 2 horas a temperatura ambiente, los pozos se lavaron con una solución buffer de RIA (0.15 M K_2HPO_4 0.3%, gelatina 0.2 %, Tween-20, pH 7.4), 4 veces por 2 minutos cada uno. Se determinó la dilución del antisuero que dio un 20 % de unión específica del trazador en ausencia de competencia con antígeno no marcado. Se usaron diluciones seriadas del antisuero anti-N/OFQ (C2) (1:1500, 1:3000, 1:6000, 1:9000 1:12000, 1:15000) en solución de buffer de RIA. Se incubó cada pozo con esta solución por un período de 24 h a 4 °C. Los pozos se lavaron 4 veces por 2 min. El porcentaje de unión específica del trazador se calculó después del conteo de radioactividad contenida en cada pozo mediante un contador gamma (Beckman). Estos experimentos nos permitieron determinar la dilución del antisuero anti-nociceptina/orfanina FQ (1: 1500) con la cual se obtuvo un 20% de unión específica del trazador y fue la dilución que se utilizó en el RIA.

Radioinmunoanálisis.

Para el radioinmunoensayo se llevaron a cabo los siguientes pasos: la incubación del anticuerpo primario anti-nociceptina/orfanina FQ (1:1500) durante 24 horas a 4°C en pozos recubiertos con proteína G. Para los pozos control (curva estándar) se adicionaron 100 µl de cada una de las diluciones de N/OFQ sintética no marcada (0.015, 0.030; 0.07; 0.15; 0.3; 0.6; 1.25, 2.5; 5.0; 10; 20 ng) más 20 µl del trazador radiactivo a cada pozo. Se realizaron pozos del 100% y unión inespecífica. Se utilizaron 10000 cuentas por minuto (cpm) del trazador péptido N/OFQ marcada con ¹²⁵I. Para los pozos en los cuales se midió el material inmunorreactivo a N/OFQ se adicionaron los extractos de tejido nervioso (cerebroides y subesofágicos), más 20 µl de trazador radiactivo a cada pozo. Todas las muestras se realizaron por triplicado. Se incubaron 24 h a 4 °C. Se contó la inmunorreactividad en un contador gamma (ICN Isomedic 4/600). Se construyó una curva estándar con los ensayos control y se calcularon los valores de concentración inhibitoria del 50 % de unión (IC₅₀) para establecer el nivel mínimo confiable de detección de N/OFQ sintética. (ver metodología detallada anexo. pág. 113).

RESULTADOS

Resultados de inmunodot.

Los anticuerpos anti-N/OFQ C₅ y C₁ (Fig. 8 y 9) no mostraron reacción cruzada con otros péptidos opioides ni con la sustancia-P. El anticuerpo se utilizó a la misma dilución en el inmunodot y en los experimentos de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica, comprobando con esto la especificidad de los anticuerpos utilizados para la N/OFQ.

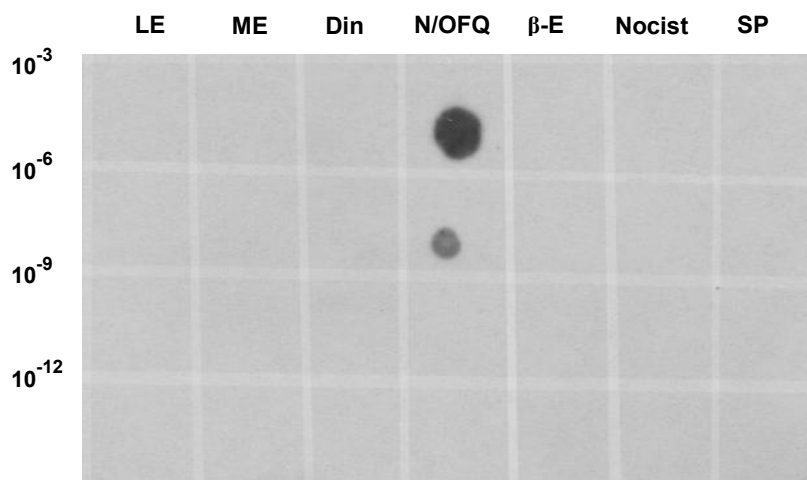


Figura 8.

Inmunodot en membrana PVDF para el anticuerpo anti-N/OFQ **C5** a una dilución de 1:150, incubado con diferentes concentraciones de Leu-encefalina (LE) Met-encefalina (ME), dinorfina A₁₋₁₇ (Din), nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ), beta-endorfina (β-E), nocistatina (Nocist) y sustancia P (SP).

Resultados Morfológicos

Controles de inmunohistoquímica: Con la omisión del anticuerpo primario no se observó inmunorreactividad. Al preincubar el anticuerpo anti-N/OFQ con su péptido sintético específico, la N/OFQ, el tejido no presentó inmunorreactividad.

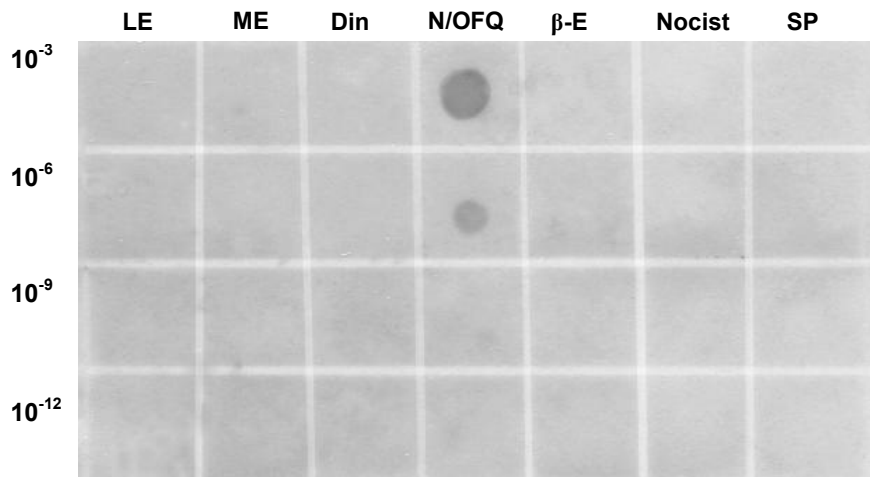


Figura 9.

Inmunodot en membrana PVDF para el anticuerpo anti-N/OFQ **C1** a una dilución de 1:100, incubado con diferentes concentraciones de Leu-encefalina, Met-encefalina, dinorfina A₁₋₁₇, N/OFQ, β-endorfina, nocistatina y sustancia P (abreviaturas en el pie de figura 8).

Con la preadsorción del anticuerpo anti-N/OFQ con el péptido dinorfina A₁₋₁₇ no se observaron cambios en la inmunorreactividad (Fig. 11, G, H, I y J; Fig. 12 A y B). Con lo anterior se demostró que el anticuerpo anti-N/OFQ reconoce específicamente al péptido endógeno N/OFQ (Fig. 12 A y B).

Distribución Anatómica

Se demostró la existencia de inmunorreactividad a N/OFQ (IR-N/OFQ) en el ganglio periesofágico del *Helix aspersa*. La distribución de la IR-N/OFQ obtenida con la técnica de inmunoperoxidasa y con la inmunofluorescencia fue la misma, por lo que los resultados están basados en las dos técnicas.

Las neuronas de los ganglios periesofágicos del caracol se han clasificado en neuronas pequeñas (de 7 a 39 μm), medianas (de 40 a 79 μm) y grandes (de 80 a 200 μm de diámetro mayor; Kerkut et al., 1975; Elekes y Nassel, 1990), por lo que en el

presente trabajo se describen de la misma manera. La IR-N/OFQ se presentó con diferentes intensidades tanto en las fibras como en las neuronas que se encontraron aisladas o en grupos. Los grupos de neuronas inmunorreactivas (NIR) se localizaron bilateralmente (ganglio derecho e izquierdo, Fig. 10) y su diámetro fue de entre 7 y 115 μm . Todos los ganglios, excepto el pleural, tuvieron NIR y las fibras inmunorreactivas (FIR) se distribuyeron en el neuropilo de todos los ganglios, en las comisuras y en los nervios. El tejido conectivo periganglionar presentó una gran cantidad de FIR en especial en la pared de los vasos hemolinfáticos.

Ganglios Cerebroides

Procerebro

En la parte lateral del procerebro se observó una cadena de NIR de 17 μm de diámetro mayor en promedio (aproximadamente 22 neuronas por ganglio, Fig 10 A), los axones atraviesan el neuropilo del ganglio (Fig 11A). En la parte inferior y lateral del procerebro existen neuronas aisladas pequeñas (7-12 μm). Este mismo tipo de neuronas se observaron alrededor de la salida de los nervios tentacular, óptico y bucal. En el neuropilo del ganglio se observó un punteado fino y fibras largas inmunorreactivas en el haz de fibras que forma el nervio tentacular (Fig. 11 A1).

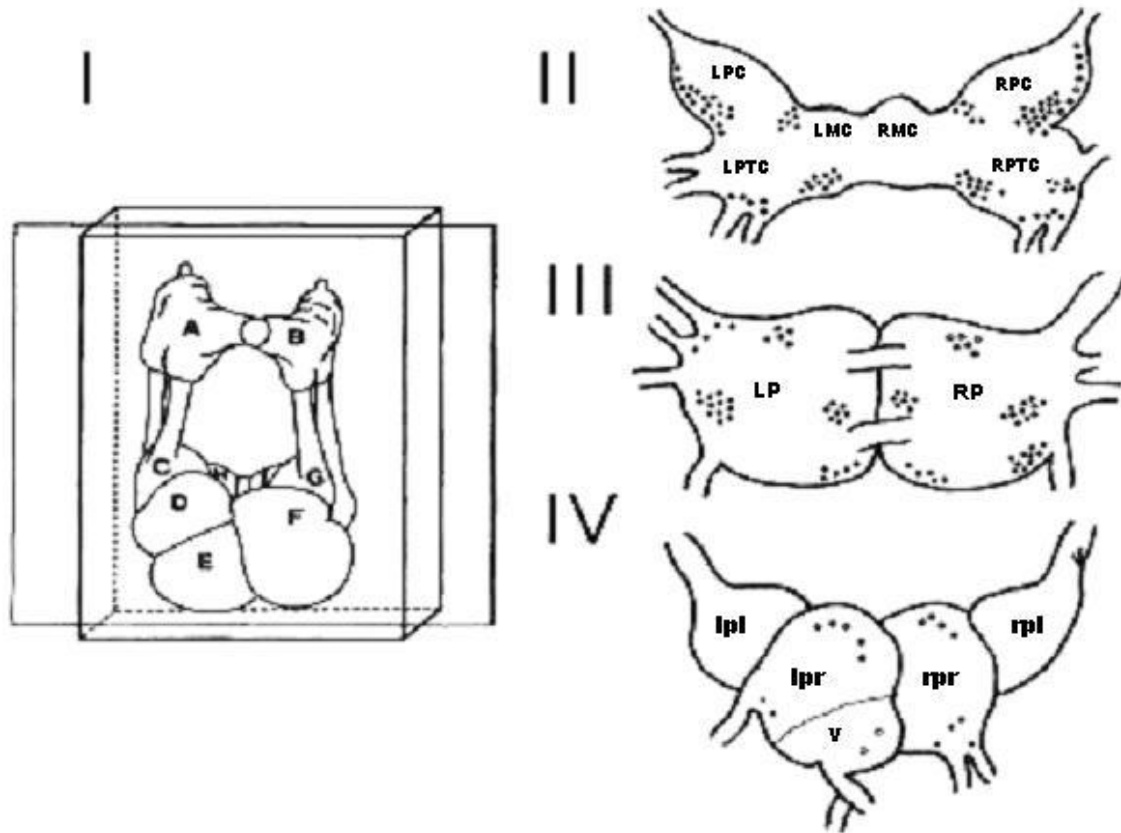


Figura 10.

Esquema de los ganglios nerviosos periesofágicos del caracol de jardín *Helix aspersa*, se muestra también la dirección de corte. **A** y **B** ganglios cerebroides derecho e izquierdo respectivamente; **C** y **G** ganglios pleurales; **D** y **F**, ganglios parietales; **E**, visceral; **H** e **I**, pedales. **II**. Ganglios cerebroides, Procerebro (**PC**) derecho (**R**) e izquierdo (**L**): postcerebro (**PTC**): mesocerebro (**MC**). **III**. Ganglios pedales (**P**). **IV**. Complejo ganglionar visceroparietopleural. Ganglios pleurales (**pl**), parietales (**pr**) y visceral (**v**). Los puntos indican la localización de los diferentes grupos neuronales y los círculos neuronas aisladas inmunorreactivas a N/O/FQ.

Mesocerebro.

En el límite entre el procerebro y el mesocerebro en su región dorsal existe un grupo de NIR pequeñas (11 y 15 μm) en número aproximado de 12 a 20 (Fig. 10 II). En el mesocerebro izquierdo existen FIR alrededor de algunas neuronas mismas que no se observaron en el mesocerebro derecho. En la comisura cerebral existen FIR con una densidad media, que se dirigen de un ganglio cerebroide al otro (Fig. 11 F).

Postcerebro.

En el postcerebro se encontraron cuatro grupos de neuronas, el primero de aproximadamente 12 a 18 neuronas de 15 μ m de diámetro (Fig 11, C). Entre el procerebro y postcerebro parte lateral cercano a la base del nervio labial se localiza un

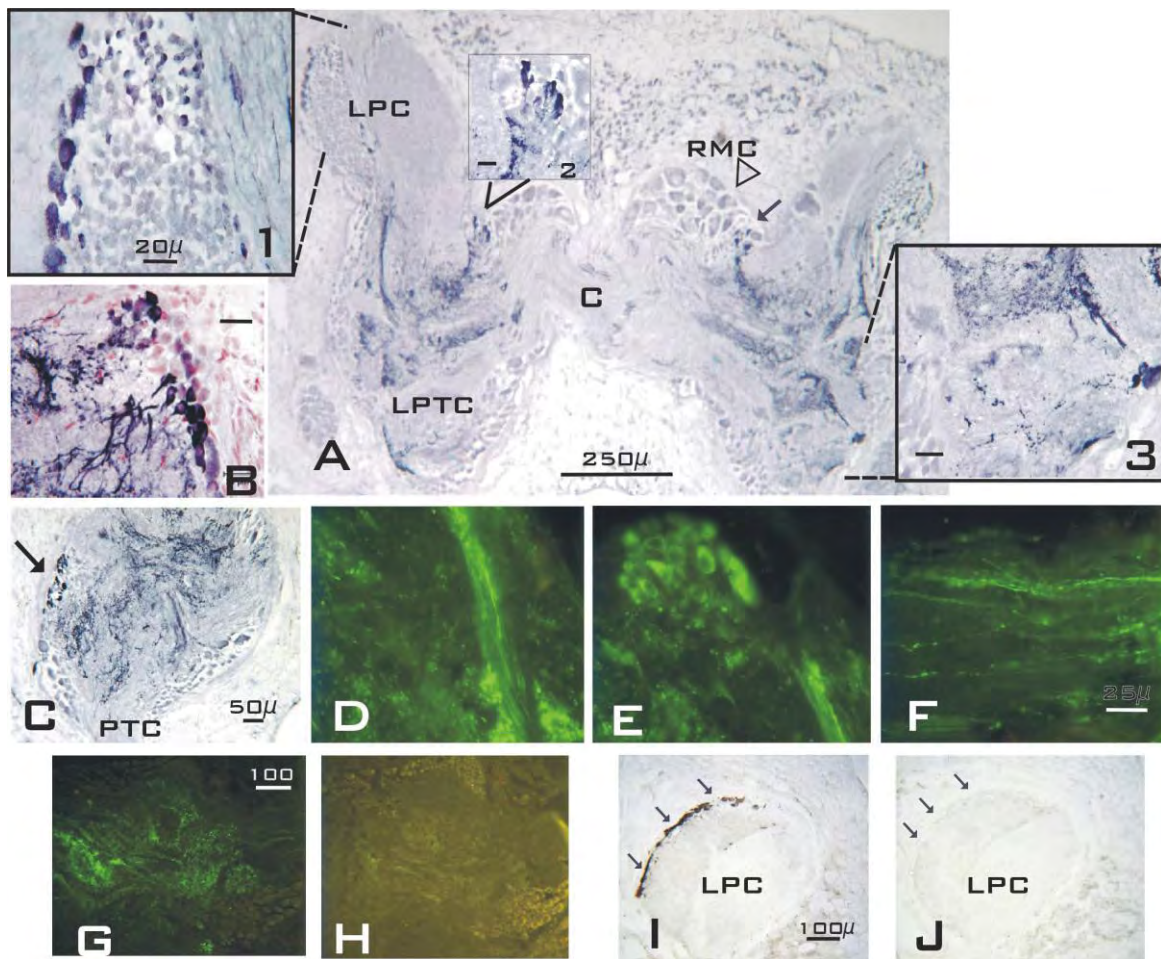


Figura 11. Ganglios Cerebroides

A. Vista panorámica de un corte coronal del ganglio cerebroides. En azul oscuro se observa la inmunorreactividad a N/OFG. **1.** Amplificación de las neuronas inmunorreactivas a N/OFG en la parte lateral izquierda del procerebro. **2.** Grupo de neuronas pequeñas IR-N/OFG en la base del mesocerebro. **3.** Fibras varicosas y grupo de neuronas pequeñas en la parte izquierda y derecha del postcerebro (**B** y **C**). **D.** Inmunofluorescencia para N/OFG en fibras del postcerebro. **E.** Grupo de neuronas pequeñas inmunorreactivas en postcerebro. **F.** Fibras inmunorreactivas en la comisura cerebral **G, H, I** y **J.** cortes seriados del postcerebro (**G** y **H**) y del procerebro (**I** y **J**) donde se muestra en **G** y **I**, neuronas y fibras inmunorreactivas y en **H** y **J** la ausencia de inmunorreactividad en el control de preadsorción. LPC (procerebro izquierdo), RMC (mesocerebro derecho), LPTC (postcerebro izquierdo), C (comisura). Barras: 1-3 y B = 20 μ m; C, D, E, F=50 μ m. G, H, I, J= 100 μ m.

segundo grupo de NIR con las mismas características. Un tercer grupo de NIR pequeñas (12 μm) se localizó alrededor de la salida de los nervios cerebro pedal y cerebro pleural. En la parte inferior y medial del postcerebro, se localizó un cuarto grupo de NIR (de entre 12-16 μm) y en número de 7-9 neuronas. El neuropilo tiene una densidad alta de FIR unas finas con varicosidades y otras gruesas lisas y los nervios contienen diferentes densidades de FIR (Fig. 11, C y D). Las fibras del neuropilo se dirigen hacia el nervio cerebropleural y cerebropedal.

Ganglios Subesofágicos:

Complejo ganglionar viscero-parietal-pleural

En este complejo ganglionar hay aproximadamente 170 neuronas inmunorreactivas a N/OFQ de entre 10-115 μm en promedio y aproximadamente 82 neuronas pequeñas (12-25 μm) localizadas junto al neuropilo. Las neuronas medianas (65; 26-49 μm) y las grandes (17; 50-115 μm) están localizadas en la superficie de diferentes regiones del complejo ganglionar.

En los ganglios parietales, además de las neuronas pequeñas localizadas junto al neuropilo, se observaron neuronas medianas y grandes distribuidas en los ganglios derecho e izquierdo. Las neuronas grandes (50-115) se localizaron en la superficie dorsomedial a los lados de las neuronas 76 y 77 (Kerkut et al., 1975) o también llamada Pa3 (Elekes y Nassel., 1990). Otras neuronas grandes están en la parte caudomedial del ganglio (Fig. 12, A). En el ganglio visceral hay una NIR grande (102 μm) cerca de la salida del nervio anal y un grupo de 15 neuronas (10 μm) localizadas junto al neuropilo en la parte inferior.

Las NIR a N/OFQ dirigen sus axones a los paquetes de fibras que atraviesan el complejo neuropilar de los ganglios y forman parte de todos los nervios principalmente del visceral, anal y palial (Fig 12, A).

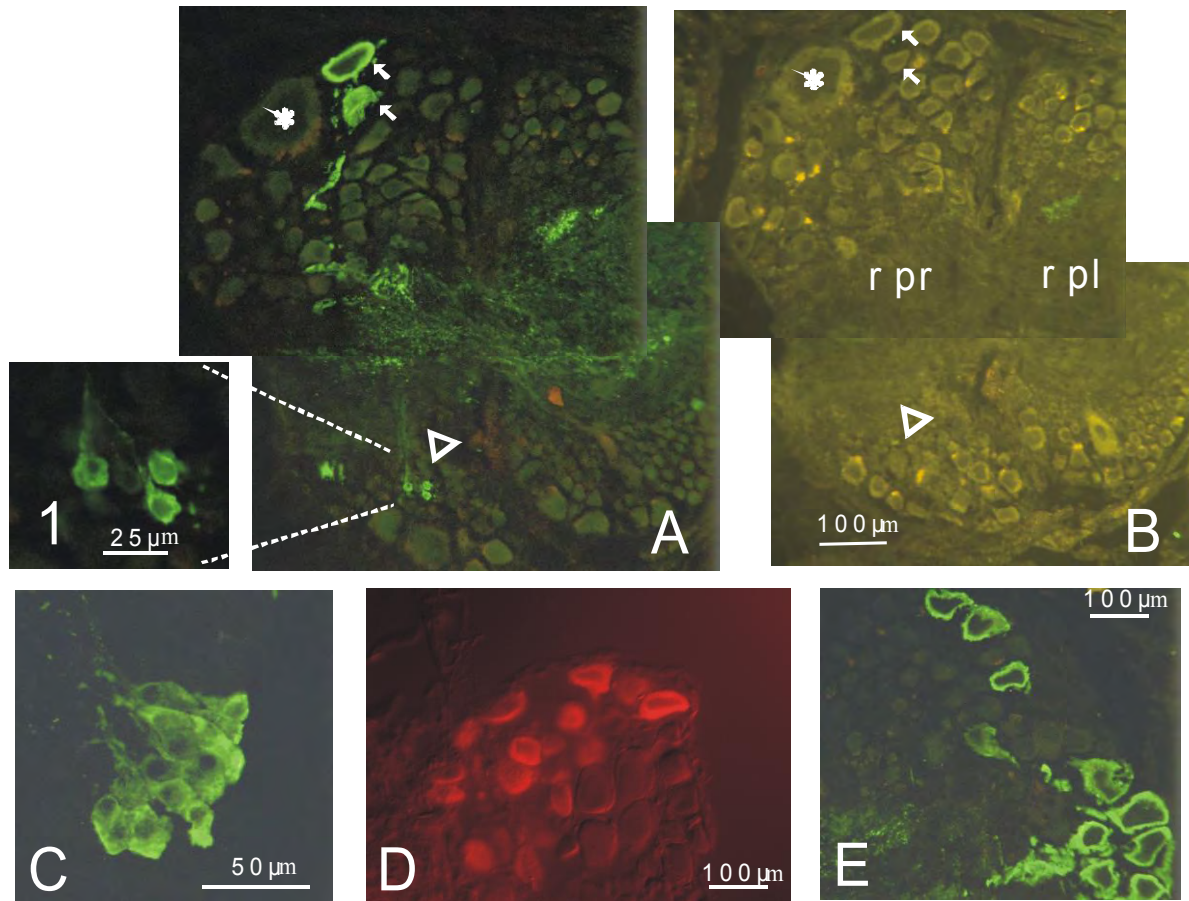


Figura 12.

Complejo ganglionar Parietal-Pleural.

A. Corte del ganglio parietal y pleural derecho. Nótese FIR abundantes en el neuropilo de los dos ganglios. Se observan NIR grandes en la parte dorsal del ganglio parietal (\uparrow), los axones proyectan hacia el neuropilo. Un grupo de NIR pequeñas cerca del neuropilo (∇). **1.** Aumento de este grupo. **B.** Control de preadsorción, corte consecutivo de **A**, el asterisco identifica a la neurona 77 descrita por el grupo de Kerkut, (1975) y las flechas a las neuronas que en **A**, fueron inmunorreactivas. **C.** Grupo de NIR pequeñas localizadas en el ganglio parietal. **D.** Corte de ganglio parietal incubado con segundo anticuerpo conjugado a TRITC, se muestran NIR medianas y grandes en la superficie dorsal del ganglio parietal. **E.** Otro corte con NIR grandes en los ganglios parietales. Ganglio parietal derecho (rpr), ganglio pleural derecho (rpl). Barras: **1**=25 μm , **C**= 50 μm y **B** y **D**=100 μm .

En los ganglios pleurales no se observaron NIR, sin embargo contienen una densidad alta de FIR localizadas en la periferia del neuropilo de los ganglios. Estas fibras se dirigen al conectivo cerebro pleural y rodean a las neuronas que se encuentran en la base del nervio cerebropedal (Fig 13 B).

Ganglios Pedales.

Existen cuatro grupos de NIR, uno en la región dorsal formado por 12 -15 neuronas medianas de 40 μm en promedio, (Fig. 14 A), un segundo grupo en la parte lateral por debajo del nervio pedal medial, formado por neuronas pequeñas (12-20 μm) en número de 16 aprox. (Fig. 14 C). El tercer grupo situado en la región medial y ventral formado por neuronas pequeñas (22 μm promedio). El cuarto grupo formado por neuronas pequeñas (12-18 μm) se localiza alrededor del nervio pedal inferior. El neuropilo de estos ganglios presenta fibras inmunorreactivas con una densidad media que atraviesan por las comisuras dorsal y ventral del ganglio. Todos los nervios de estos ganglios contienen fibras inmunorreactivas con diferentes densidades (Fig 14).

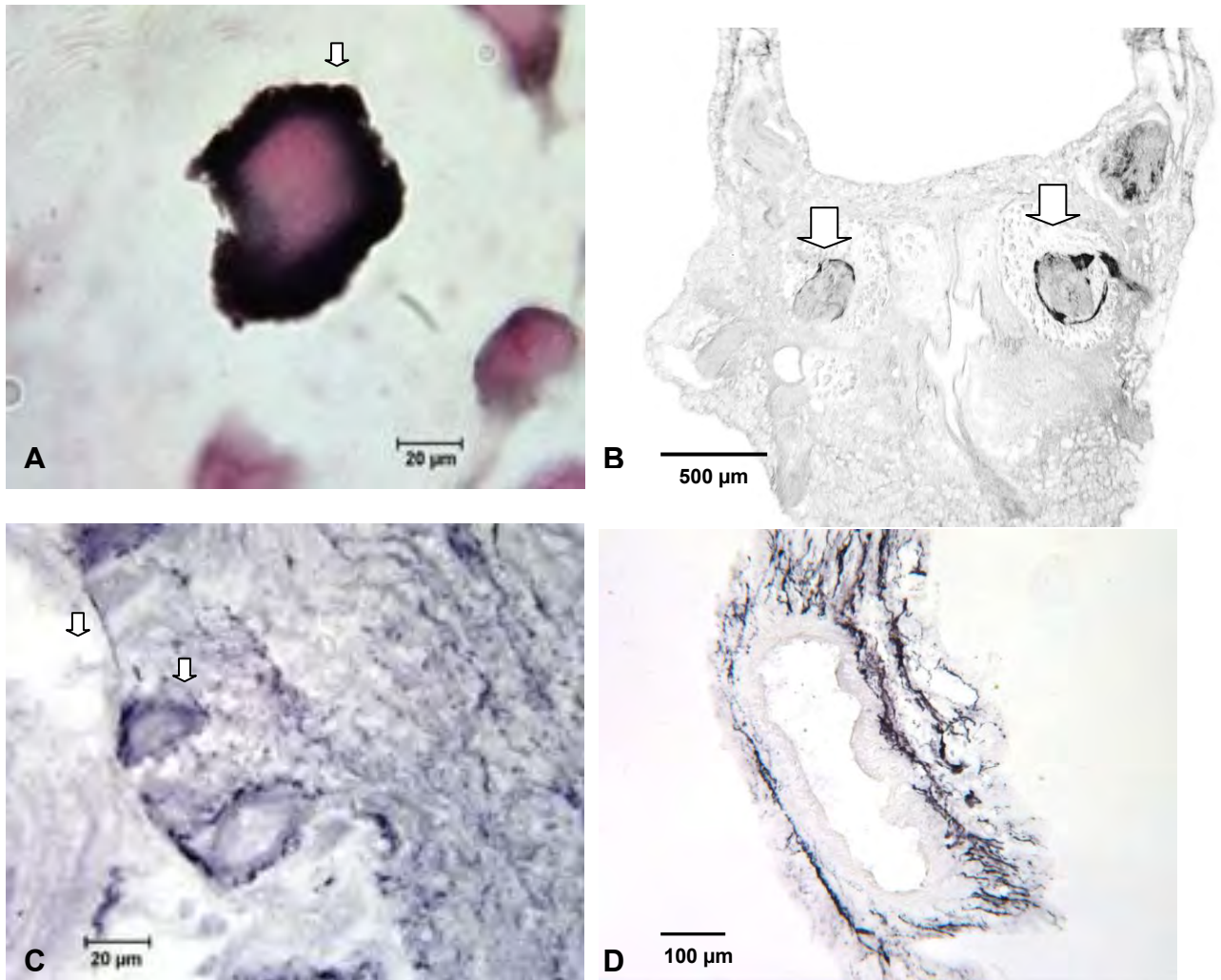


Figura 13.

A. Ganglio parietal. NIR grande en la parte medial del ganglio. **B.** Corte coronal a nivel de los ganglios pleurales, nótese las fibras inmunorreactivas localizadas en la periferia del neuropilo (↓). **C.** Parte inferior del conectivo cerebro pleural. Se observan fibras inmunorreactivas con una densidad alta y algunas fibras rodean a las neuronas (↓). **D.** Corte de aorta nótese las fibras inmunorreactivas abundantes en la capa externa.

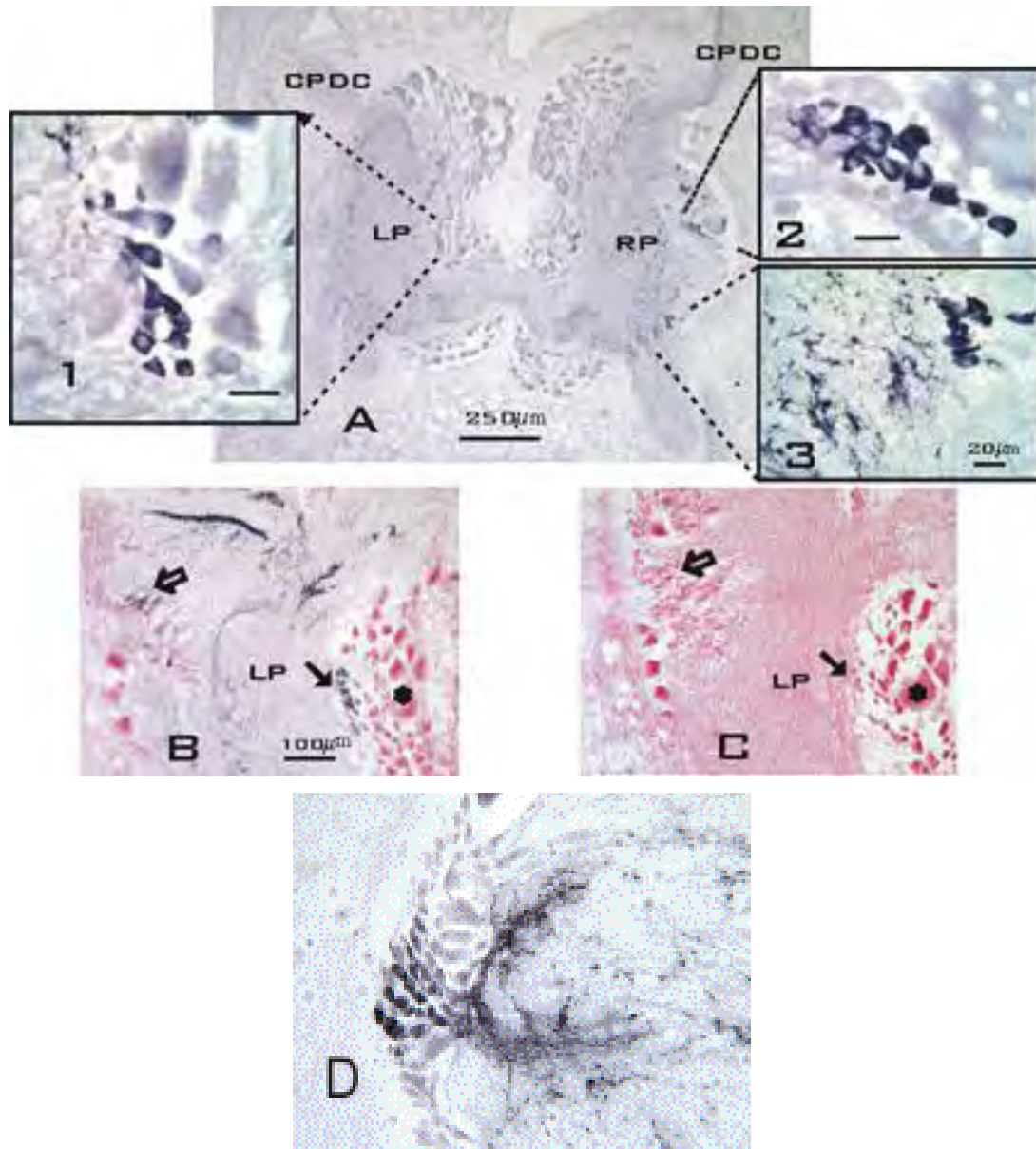


Figura 14.
Ganglio pedal

A. Vista panorámica de un corte histológico de los ganglios pedales. Nótese la presencia de fibras inmunorreactivas a N/OFQ abundantes en el neuropilo, en la comisura, los nervios y el conectivo (CPDC). En el ganglio pedal hay diferentes grupos de neuronas pequeñas inmunorreactivas junto al neuropilo. **1-3**, aumento de grupos de neuronas pequeñas inmunorreactivas. En **3**, fibras inmunorreactivas con varicosidades finas en el neuropilo. **B** y **C**, cortes seriados del ganglio pedal. En **B**, se muestra la presencia de fibras inmunorreactivas y de 2 grupos de neuronas inmunorreactivas (\downarrow δ \downarrow). En **C**, control de preadsorción en donde no se observa inmunorreactividad, las flechas indican la localización de los grupos neuronales de **B**. **D** grupo de neuronas y fibras inmunorreactivas en la parte laterodorsal del ganglio pedal izquierdo. Conectivo cerebro pedal (CPDC), ganglio pedal izquierdo y derecho (LP, RP) (Barras: 1-3, D = 20 μ m, **B** y **C**= 100 μ m).

Doble marcaje para nociceptina/orfanina FQ y encefalinas

En el análisis con microscopía confocal se pudo observar que la N/OFQ y las encefalinas se localizan en neuronas y fibras distribuida en todos los ganglios de anillo periesofágicos con una distribución similar, pero no existe colocalización. Como ejemplo se muestran los ganglios cerebroides (Fig. 15 A, B, C; Fig. 16).

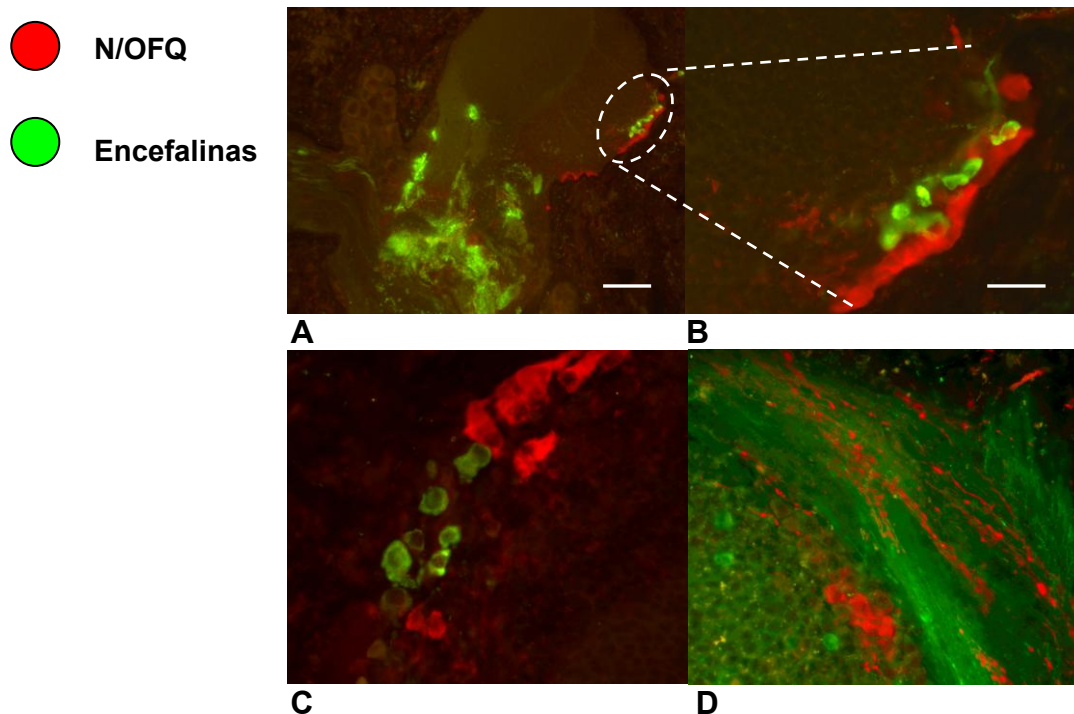


Figura 15.

Inmunofluorescencia de doble marcaje para N/OFQ (TRITC, rojo) y encefalinas (FITC, verde). Cortes coronales de los ganglios cerebroides de *H. aspersa*. **A.** Vista panorámica del ganglio cerebroide derecho. Se observan neuronas y fibras inmunorreactivas a N/OFQ y a encefalinas. **B.** Aumento de las neuronas inmunorreactivas del procerebro en **A.** **C.** Neuronas inmunorreactivas a N/OFQ y encefalinas en el procerebro izquierdo. **D.** Fibras y neuronas inmunorreactivas en el procerebro, las fibras se dirigen al nervio tentacular. Nótese que no colocalización. Barras: A = 100 μ m, B, C, D = 25 μ m.

Las neuronas positivas a N/OFQ se localizan en la parte lateral externa del procerebro, junto a ellas se encuentran neuronas positivas a encefalinas y fibras

abundantes en el neuropilo, unas positivas a N/OFQ y otras a encefalinas. Las neuronas inmunorreactivas a N/OFQ están localizadas tanto en el

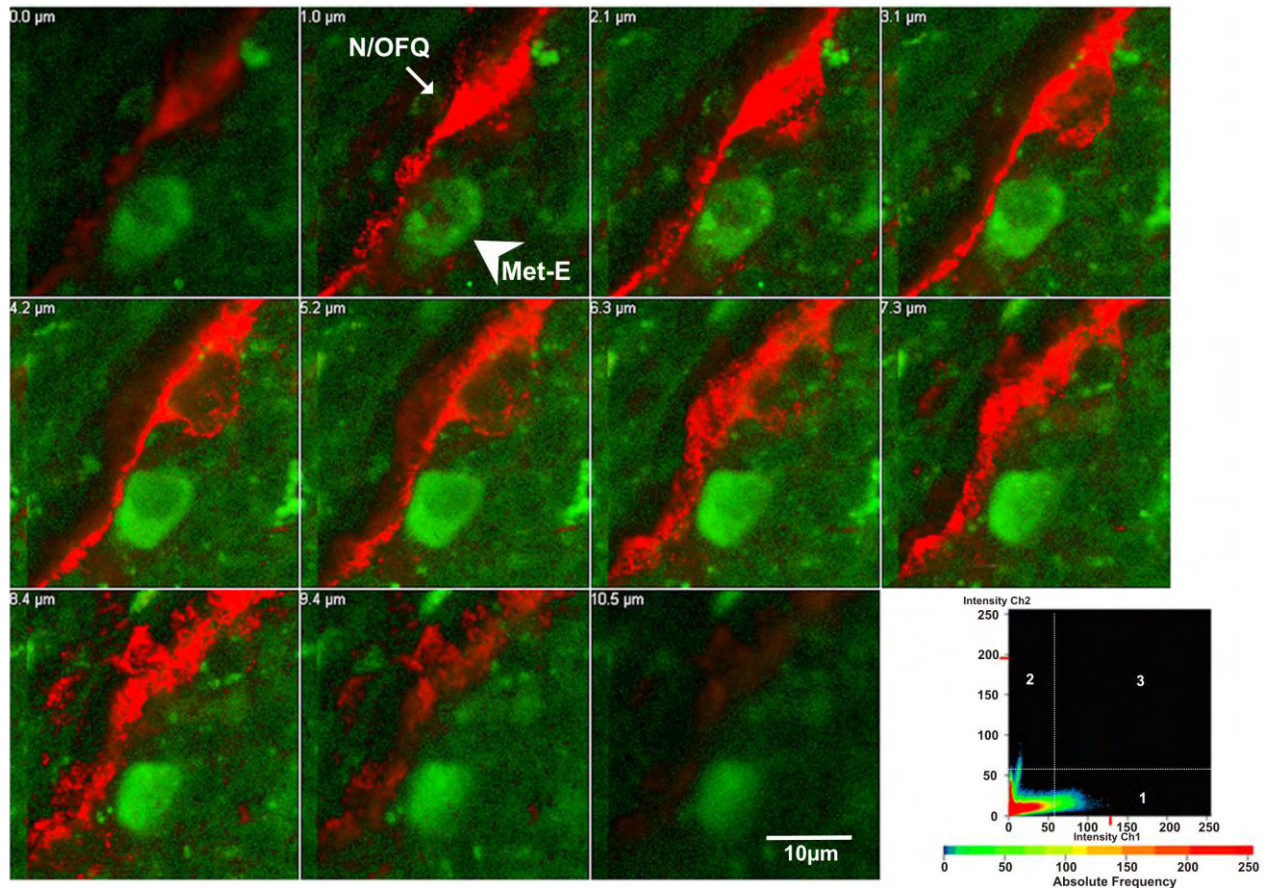


Figura 16.

Análisis confocal. Neuronas de la parte lateral del procerebro procesados con inmunofluorescencia de doble marcaje, canal rojo para N/OFQ y canal verde para encefalinas. Se crearon imágenes de varias secciones ópticas obtenidas a intervalos de 1 μm en los ejes Y y Z. Al promedio de cada serie se realizó un análisis de colocalización con el programa LMS de Zeiss. En el diagrama de dispersión se muestra en la región 1 (FITC), en la región 2 (TRITC) y en la región 3 la dispersión de los pixeles en donde habría colocalización de los dos fluoróforos que está ausente. El coeficiente de colocalización fue de 0.002, lo que significa que no hay colocalización.

procerebro derecho como en el izquierdo y son neuronas pequeñas unidas al tejido conectivo periganglionar. Las neuronas inmunorreactivas a encefalinas se localizan junto a las de N/OFQ, pero no se encuentran unidas al tejido conectivo. Las células inmunorreactivas a encefalinas son globulares y más pequeñas que las

inmunorreactivas a N/OFQ. Las fibras inmunorreactivas para N/OFQ y encefalinas son abundantes en el neuropilo (Fig. 15 D). En las fibras inmunorreactivas se observan varicosidades, los dos grupos de fibras inmunorreactivas para encefalinas y N/OFQ conectan el procerebro con el postcerebro y llegan al nervio tentacular.

Resultados Microscopia electrónica.

Procerebro

Las neuronas inmunorreactivas a N/OFQ del procerebro se estudiaron a nivel de microscopia electrónica. La morfología de estas neuronas fue la siguiente: Están situadas en la parte dorsolateral del procerebro, su cara lateral externa está unida al tejido conectivo periganglionar que forma la pared del seno hemolinfático lateral (Fig. 17). Su cara interna está cubierta por prolongaciones de células gliales y se encuentra separada de las neuronas globulares típicas del procerebro por un espacio intercelular que atraviesa el procerebro con dirección dorsoventral. En la cara dorsal y ventral de estas neuronas se unen a otra neurona del mismo tipo y forman pequeñas cavidades que se conectan con el espacio intercelular (Fig 17 y 18). El citoplasma, contiene una gran cantidad de gránulos, en su mayoría electrodensos de 140 nm, muchos de los cuales fueron inmunorreactivos a N/OFQ (Fig. 18 A, B). Los axones de estas células emergen por la cara lateral, atraviesan el procerebro hasta el neuropilo. No se pudo seguir su dirección exacta ya que en el neuropilo del procerebro y postcerebro se encuentran gran cantidad de fibras marcadas. Los axones en el neuropilo contienen gránulos positivos a N/OFQ. Estas células poseen las características de las células

neuroendocrinas.

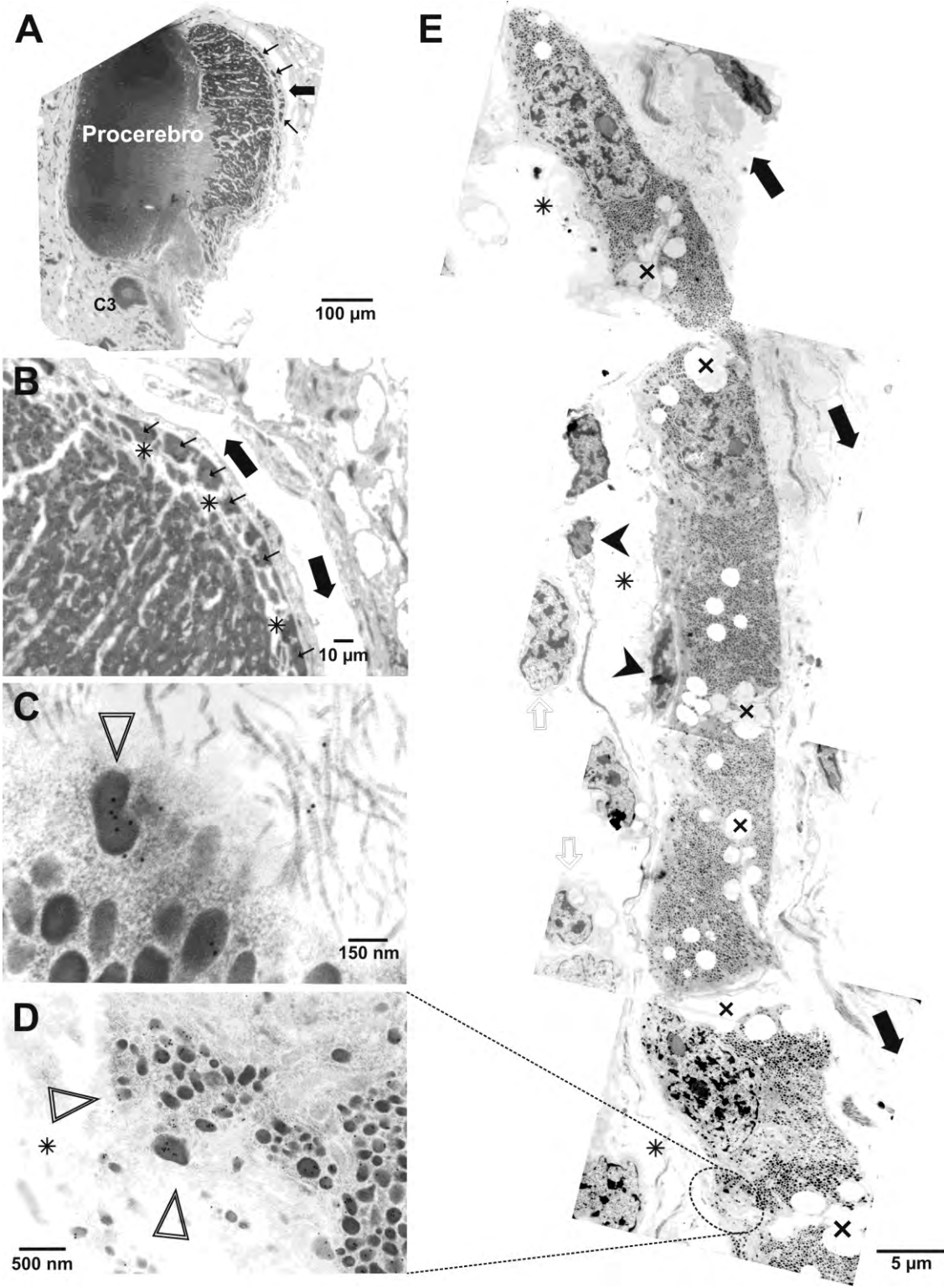


Figura 17.

Figura 17.

A. corte semifino del procerebro las flechas delgadas y negras señalan las neuronas de la parte dorsolateral. La flecha gruesa y negra indica el seno hemolinfático. **B.** Aumento de la zona dorsolateral seno hemolinfático (flechas gruesas), flechas delgadas neuronas de la parte dorsolateral, asteriscos espacio intercelular. **C.** Vesículas electrodensas marcadas con gránulos de oro coloidal en el citoplasma de las neuronas dorsolaterales. **D.** Aumento de la zona marcada en E, se observan vesículas electrodensas marcadas (triángulos sin relleno). **E.** Fotocomposición de microfotografías electrónicas tomadas de cortes finos de procerebro con inmunohistoquímica para N/OAQ con oro coloidal. Se muestran las neuronas inmunorreactivas a N/OAQ en la parte dorsolateral del procerebro. Nótese que la neurona tiene una gran cantidad de vesículas marcadas en el citoplasma. Se observa su cara lateral externa unida al tejido conectivo que rodea al seno hemolinfático. Su cara interna cubierta por prolongaciones de células gliales y un espacio intercelular que las separa de las neuronas globulares (asterisco). Sus caras laterales se unen a otra de estas neuronas y forman pequeñas cavidades que se conectan con el espacio intercelular (X).

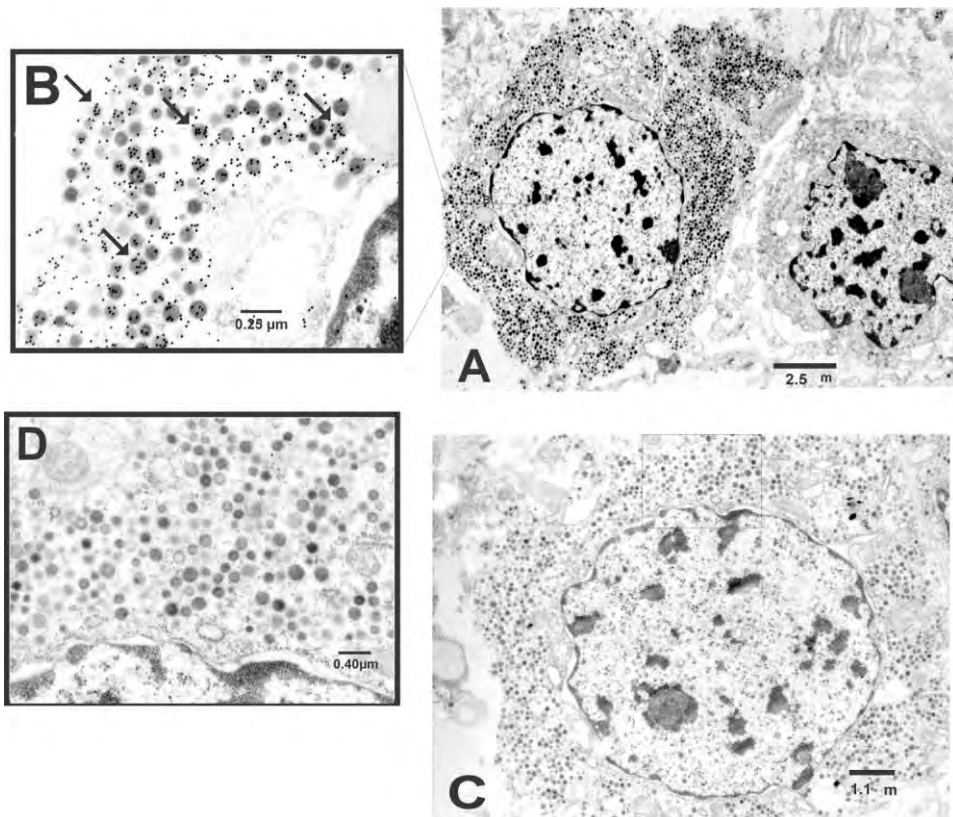


Figura 18.

Fotomicrografías electrónicas de cortes finos seriados a nivel de la parte lateral del procerebro. Se realizó inmunocitoquímica postinclusión para la N/OAQ con un segundo anticuerpo conjugado a oro coloidal de 15nm. **A.** Neurona con una gran cantidad de vesículas en el citoplasma. **B.** Amplificación de la neurona en A, las flechas (↑) indican algunas de las vesículas marcadas con oro coloidal. **C.** Corte seriado de la neurona en A, control con omisión del primer anticuerpo anti-N/OAQ. Nótese la ausencia de inmunorreactividad en el citoplasma. **D.** Amplificación de la neurona de C, nótese las vesículas sin marca.

Ganglios parietales.

En los ganglios subesofágicos las NIR contienen vesículas densas marcadas, en menor cantidad que las del procerebro (Fig. 19 A, B). El tamaño de las neuronas de estas regiones son de medianas a grandes y son de tipo pseudomonopolar.

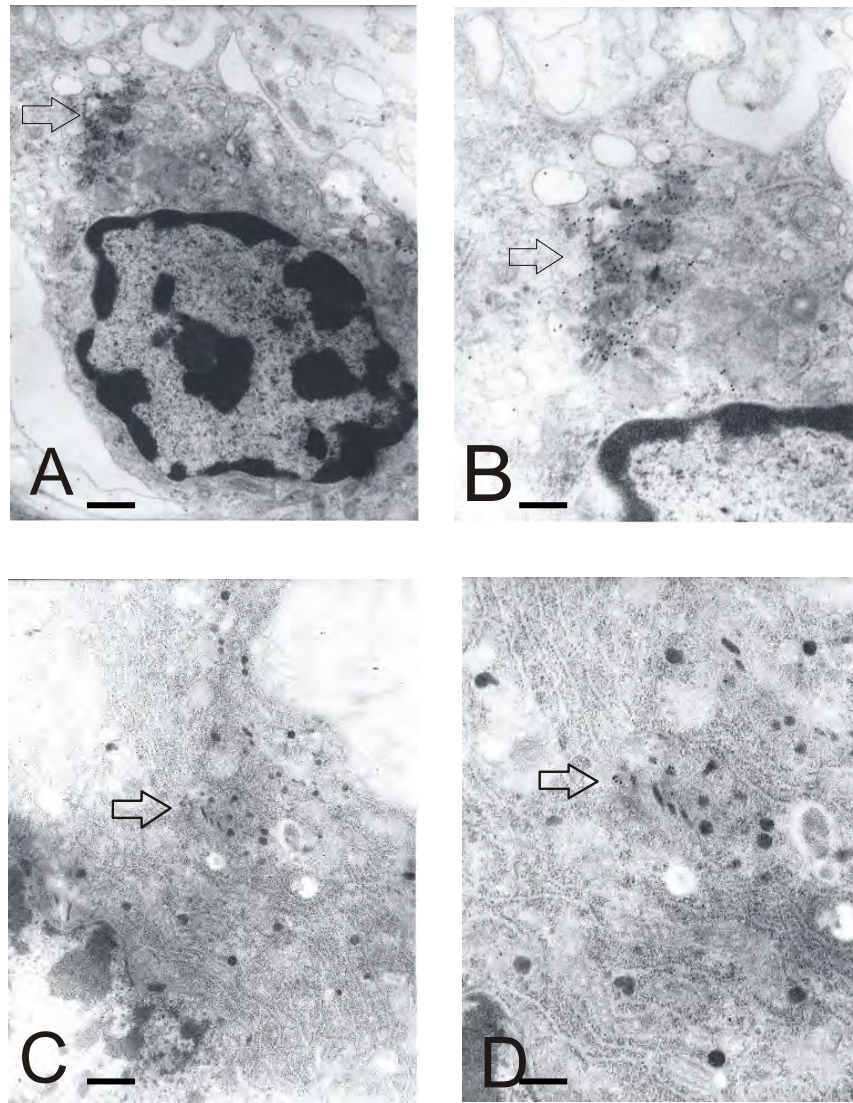


Figura. 19.

Fotomicrografía electrónica de neuronas inmunorreactivas a N/OFQ de la parte lateral del ganglio parietal. Se realizó inmunocitoquímica postinclusión para la N/OFQ con un segundo anticuerpo conjugado a oro coloidal de (15nm). **A.** Neurona dónde se observan vesículas electrodensas marcadas en el citoplasma. **B.** Amplificación de la neurona en **A.** **C.** Otra neurona inmunorreactiva de los ganglios parietales, las flechas indican las vesículas marcadas con oro coloidal. **D.** Amplificación de la neurona en **C.** Barras A = 750 nm; B = 340 nm; C = 600 nm y D = 450 nm.

Termonocicepción

Como resultado de los experimentos piloto para estandarizar la prueba, obtuvimos que la temperatura de 45 ± 0.5 °C fue en la que los caracoles presentaron la conducta termonociceptiva con una latencia de entre 5 a 7 s. Las latencias de los grupos controles naive y vehículo no presentaron diferencias significativas, por lo que únicamente se utilizó el control vehículo. La conducta se caracterizó como la elevación de la parte anterior del pie y retracción de la cabeza hacia la concha (Fig 20 C). El tiempo de corte fue de 30 s, con el que no se observó daño tisular a la temperatura de la plancha utilizada.

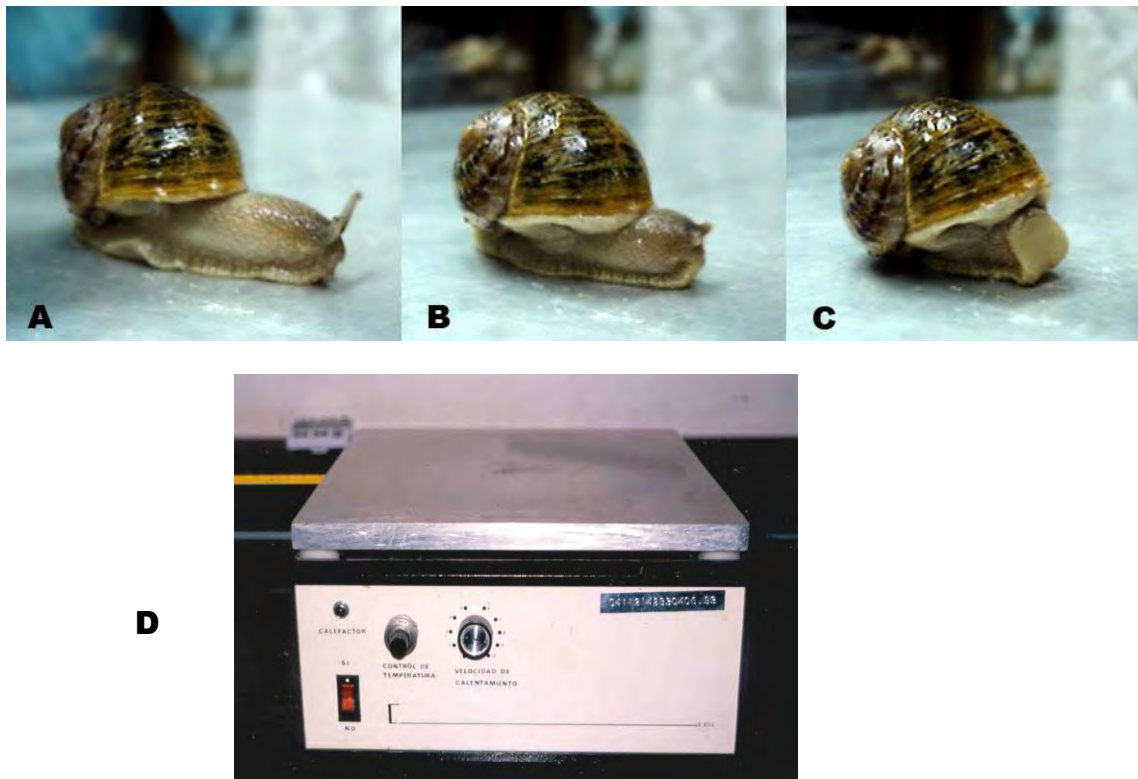


Figura 20.

Secuencia fotográfica que ilustra la respuesta presentada por el caracol *Helix aspersa* en la prueba de la plancha caliente a 45 °C (D). **A.** Caracol en la plancha caliente al t=0. **B.** Caracol iniciando el levantamiento de la parte anterior del pie. **C.** Levantamiento del pie y retracción de la cabeza hacia la concha. Esta última respuesta es el punto final de la conducta termonociceptiva.

Curvas temporales y dosis respuesta

Con los resultados obtenidos de la evaluación de la conducta se graficaron los valores de las latencias como una función del tiempo y de la dosis. El acortamiento de la latencia expresa el efecto pronociceptivo, mientras que el aumento en la duración de la latencia expresa el efecto antinociceptivo.

N/OFQ y Naloxona

Las curvas temporales y dosis respuesta de la administración de N/OFQ (1-30 ng/g) y naloxona (30-3000 ng/g) en los caracoles en la prueba de la plancha caliente a los 15, 30, 45 y 60 min postinyección, se muestran en la Fig. 21, panel A y B, respectivamente. Los dos fármacos producen un acortamiento significativo de la latencia de la conducta termonociceptiva. Para las dosis altas de N/OFQ (10 y 30 ng/g), el efecto máximo (reducción de la latencia de 47% y 50.8%, respectivamente) se observó a los 15 y 30 min después de la administración, volviendo a la basal a los 45 min. La naloxona presentó su efecto máximo pronociceptivo a los 30 min post-inyección y desapareció 30 min más tarde. El análisis de las curvas dosis respuesta para N/OFQ y naloxona revela que estos fármacos tienen una eficacia similar, pero la N/OFQ fue aproximadamente 30 veces más potente que la naloxona para producir la respuesta pronociceptiva (Fig. 21, panel C, Tabla 2).

Phe¹Ψ, Dinorfina A₁₋₁₇ y Morfina

La administración de los fármacos Phe¹Ψ, (Fig. 22, panel A) dinorfina A₁₋₁₇ (panel B), y morfina (panel C) produjeron un aumento significativo de la duración de la latencia (antinocicepción o analgesia) con respecto al control.

La morfina y dinorfina A₁₋₁₇ mostraron un efecto máximo (latencia = 30 s) a los 60 min post inyección y regresaron a la basal (latencia = 5 – 7 s), a los 90 min. El efecto máximo de la Phe¹Ψ se presentó a los 45 min postinyección y se extinguió a los 120 min. La Phe¹Ψ tuvo una eficacia similar a la morfina y a la dinorfina A₁₋₁₇. El análisis del área bajo la curva de los tres compuestos se calculó tomando en cuenta el curso temporal de las dosis más altas utilizadas para cada fármaco (Phe¹Ψ 560 ng/g, dinorfina A₁₋₁₇ 5.6 ng/g, y morfina 10,000 ng/g). Los valores del área bajo la curva fueron: 1599 ± 46.4, 1215.8 ± 16.3 y 1107.8 ± 14.9, respectivamente. El análisis reveló que la Phe¹Ψ produjo un efecto antinociceptivo más rápido y prolongado que los otros dos compuestos antinociceptivos (Fig. 22). Para las latencias de los grupos se realizó un análisis de varianza Kruskal-Wallis y una prueba de Tukey (*p<0.05).

Las diferencias en la potencia (curvas ajustadas; Fig. 22 D), demostró que la Phe¹Ψ es aproximadamente 50 veces menos potente que la dinorfina A₁₋₁₇, pero 30 veces más potente que la morfina, con base en la estimación de los valores de ED₅₀ (Tabla 2.)

Tabla 2. Parámetros de las Curvas Dosis-Respuesta

	E _{max} (s)	ED ₅₀ (ng/g)	95% Intervalos de confianza
N/OFQ	6.06 ± 0.40	4.9	[4.78 - 5.02]
Naloxona	5.8 ± 0.10	290.6	[287.9 - 293.3]
Phe ¹ Ψ	29.4 ± 0.9	177.2	[135.2 - 219.2]
Dinorfina A ₁₋₁₇	30 ± 0.5	3.4	[2.91 - 3.89]
Morfina	30.2 ± 0.4	5547.9	[5284 - 5812]

Curvas dosis-respuesta ajustadas elaboradas con el programa Win-nonlin (Pharsight, Co. Version 2.1) para calcular los valores de ED₅₀.

Curvas Temporales y Dosis Respuesta de N/OFQ y Naloxona

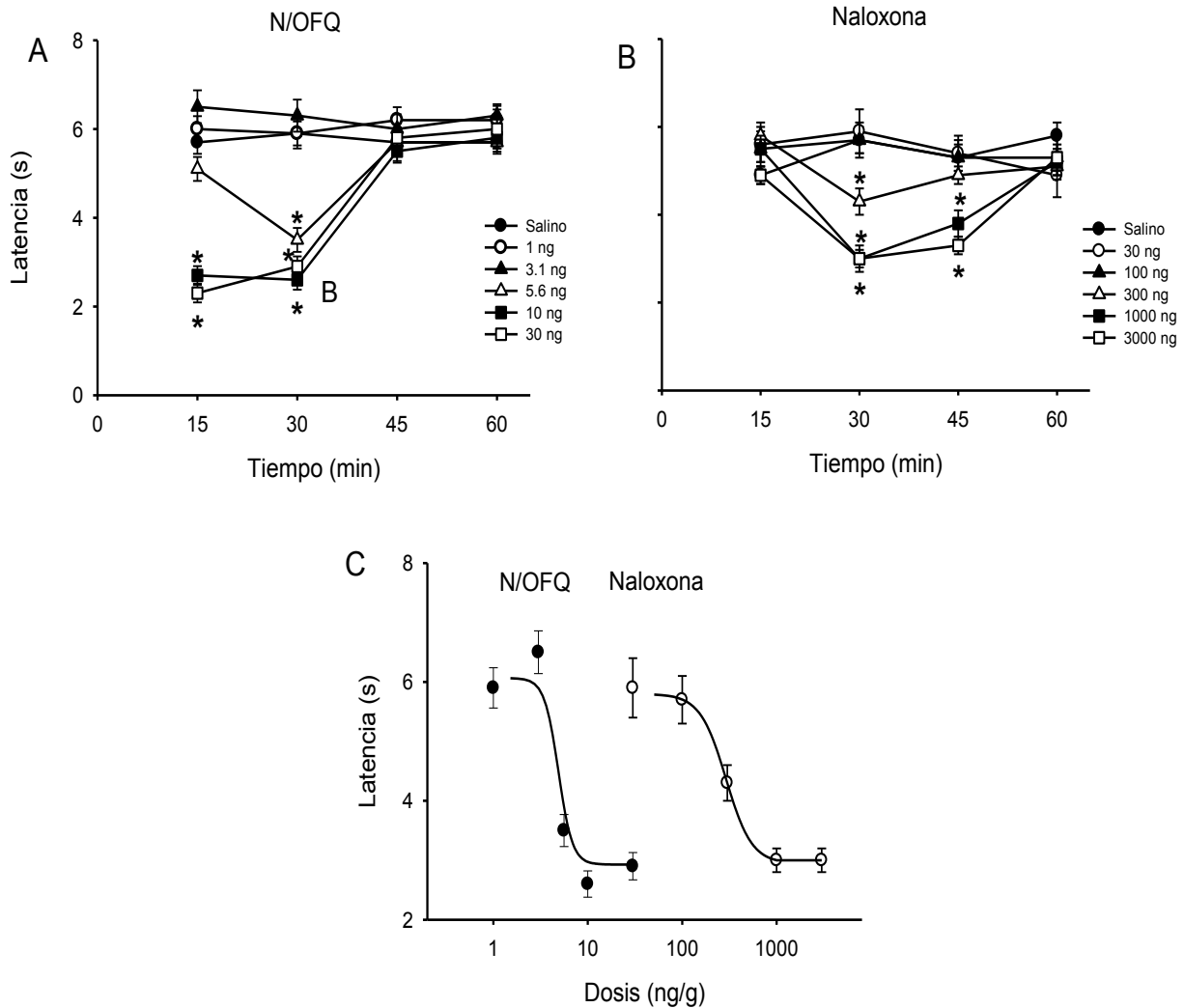


Figura 21.

Curso temporal (A, B) y curvas dosis respuesta (C). Se muestra el efecto de la nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) y naloxona sobre la latencia a la presentación de la respuesta termonociceptiva del *Helix aspersa* en la prueba de la plancha caliente. Se administraron dosis crecientes de cada fármaco (1 -30 ng para N/OFQ y 30 - 3000 ng para naloxona), en grupos independientes de caracoles en el tiempo 0 (t=0) y estos se probaron a los 15, 30, 45 y 60 min post-inyección. Cada punto representa el promedio de las latencias de 10 caracoles \pm error estándar para cada dosis y tiempo. La N/OFQ tuvo un acortamiento de la latencia a los 15 y 30 min post-inyección, y la naloxona a los 30 y 45 min. Para la comparación entre grupos se realizó un análisis de varianza Kruskal-Wallis y una prueba de Tukey (* $p < 0.05$). La curva dosis repuesta para cada fármaco se realizó en el tiempo en el que se presentó el efecto máximo (30 min).

Curso Temporal y Curvas Dosis Respuesta de [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂, Dinorfina₁₋₁₇ y Morfina

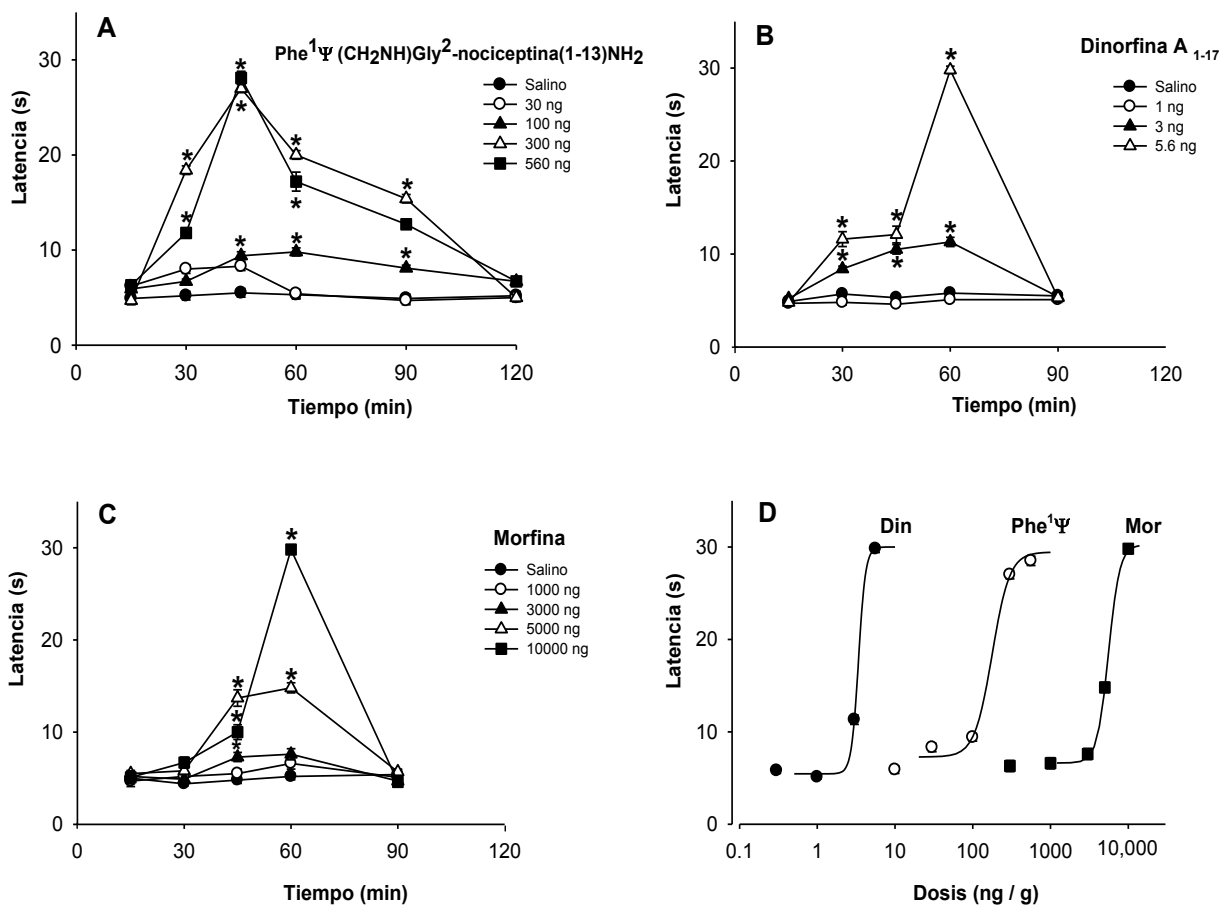


Figura. 22.

Curso temporal de la Phe¹Ψ (A), dinorfina A₁₋₁₇ (B), morfina (C) y curvas dosis respuesta (D). Se muestra el efecto de la Phe¹Ψ, dinorfina₁₋₁₇ y morfina sobre la latencia a la presentación de la respuesta termonociceptiva del *Helix aspersa* en la prueba de la plancha caliente. Se administraron en el tiempo 0 (t=0) dosis crecientes de los tres fármacos en grupos independientes de caracoles y se probaron a diferentes tiempos después de la administración (15–120 min para Phe¹Ψ y 15–90 min para dinorfina A₁₋₁₇ y morfina). Cada punto representa el promedio de las latencias de 10 caracoles ± error estándar para cada dosis y tiempo. Se realizó un análisis de varianza Kruskal-Wallis y una prueba de Tukey (*p<0.05). La curva dosis respuesta para cada fármaco se realizó en el tiempo en el que se presentó el efecto máximo, 60 min para morfina y dinorfina, y 45 min para Phe¹Ψ.

Experimentos de interacción

Estos experimentos se realizaron para determinar la interacción de los fármacos que actúan en el receptor NOP (N/OFQ y Phe¹Ψ) con fármacos que actúan en los receptores opioides clásicos (morfina, dinorfina y naloxona).

N/OFQ más Phe¹Ψ o morfina o dinorfina.

Los resultados de la administración de N/OFQ (10 ng/g) más Phe¹Ψ (560 ng/g) o morfina (10,000 ng/g) o dinorfina A₁₋₁₇ (5.6 ng/g) se muestran en la Fig. 23 (panel A). La latencia obtenida con la combinación de N/OFQ y Phe¹Ψ no cambia con respecto al grupo control (solución salina). El efecto pronociceptivo de la N/OFQ y el efecto antinociceptivo de la Phe¹Ψ desaparecen cuando los dos compuestos son co-administrados (panel A, barra 4). La administración de N/OFQ más morfina o dinorfina A₁₋₁₇, produce un acortamiento de las latencias obtenidas con la administración de morfina o dinorfina A₁₋₁₇ sin combinar, lo que significa una disminución del efecto antinociceptivo de estos compuestos.

N/OFQ más naloxona

Los caracoles tratados con dosis subefectivas de N/OFQ (1 ng/g) y naloxona (100 ng/g), compuestos que producen nocicepción mostraron un acortamiento significativo de la latencia con respecto al grupo control (solución salina) y a las latencias obtenidas de cada uno de los fármacos individualmente (Fig. 23, B).

Morfina más naloxona

Con la combinación de dosis efectivas de morfina (10,000 ng/g) y naloxona

Experimentos de Interacción

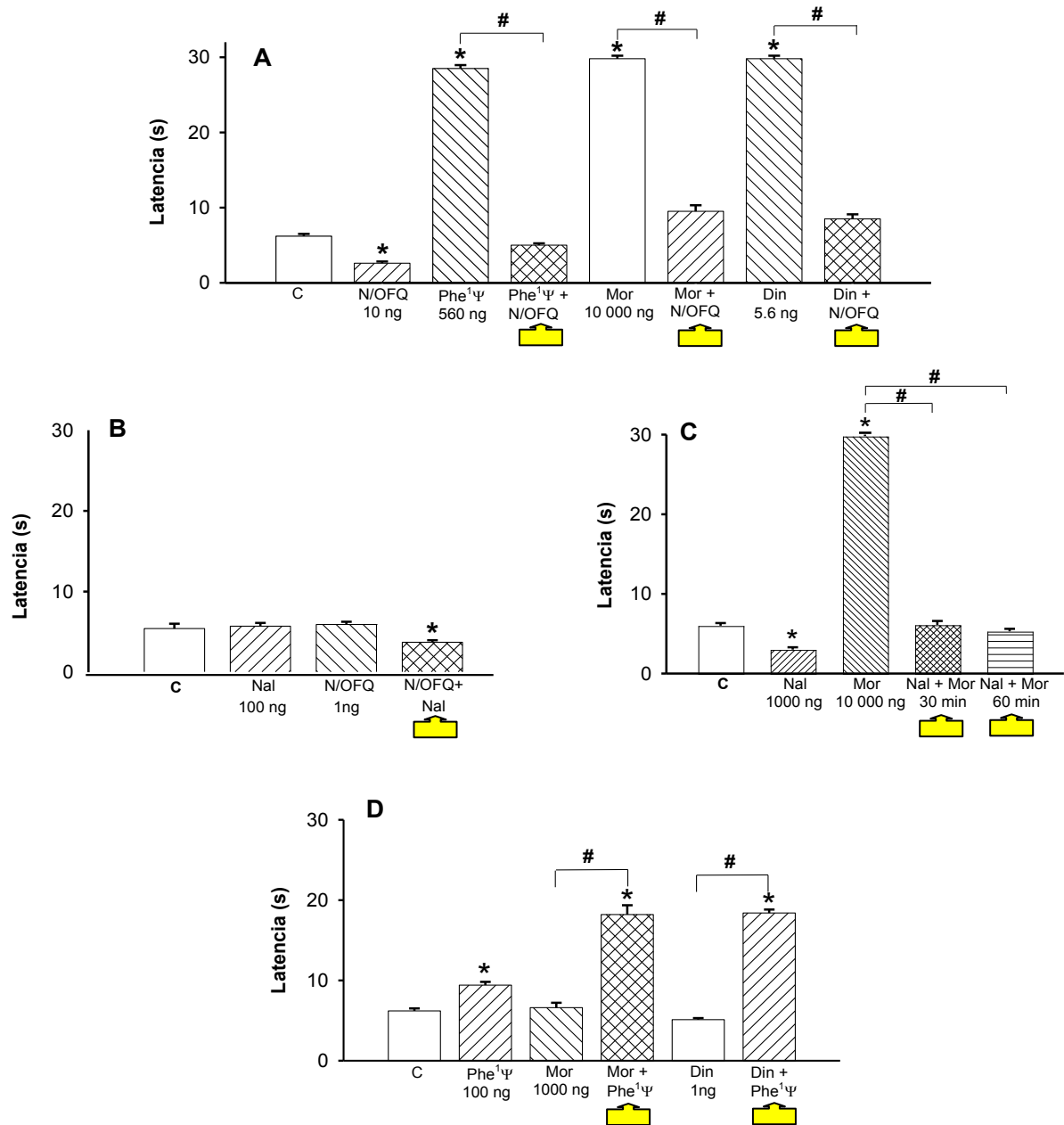



Figura 23.

Experimentos de Interacción. Se muestran las latencias a la presentación de la conducta termonociceptiva de los diferentes grupos de caracoles, después de la administración (en el hemocele) sola o combinada de los fármacos y probados en la plancha caliente. Para la administración combinada, se seleccionó el tiempo en el que cada compuesto presenta el efecto máximo. **Panel A:** control salino (C), tratados individualmente con 560 ng/g de Phe¹Ψ (t=45 min), 10,000 ng/g de morfina (Mor, 60 min) o 5.6 ng/g de dinorfina A₁₋₁₇ (Din, 60 min) o en combinación con 10 ng/g de N/OFQ (30 min). **Panel B:** Latencias del grupo de animales control y tratados con dosis subefectivas de naloxona (100 ng/g) o N/OFQ (1 ng/g) solas o en combinación. La naloxona y la N/OFQ se administraron simultáneamente en el t=0 y los

caracoles se probaron a los 30 min. **Panel C:** Latencias de los caracoles inyectados con naloxona (Nal, 1000 ng/g) o morfina (Mor, 10,000 ng/g) sola o en combinación. El máximo efecto de la naloxona se observó a los 30 min, mientras que el de la morfina a los 60 para el control de esta diferencia temporal el efecto del tratamiento combinado se evaluó a los 30 min postinyección (Nal, 1000 ng/g) y al t=60 min (Mor, 10,000 ng/g). **Panel D:** Latencias de los caracoles inyectados con dosis subefectivas de morfina (Mor, 1000 ng/g) o dinorfina A1-17 (Din, 1 ng/g) sola o en combinación con Phe¹Ψ (100 ng/g). Para las combinaciones Mor+Phe¹Ψ o Din+Phe¹Ψ, Mor o Din se administró al t=0, Phe¹Ψ al t=15 min y los caracoles se probaron al t=60 min. Cada barra representa el promedio ± error estándar de 10 caracoles (Análisis de varianza Kruskal-Wallis y prueba de Tukey, *, # p<0.05). Los asteriscos indican la comparación contra el grupo control, # indican los puntos de comparación entre el efecto del fármaco solo y con la misma dosis usada en la combinación. La figura  marca el resultado de las diferentes combinaciones.

(1000ng/g) no cambia significativamente la duración de la latencia con respecto al control. La latencia obtenida por la combinación de estos fármacos es de más larga duración que la obtenida con la naloxona y más corta que la obtenida con la morfina en los dos tiempos probados (30 y 60 min), lo que significa una disminución de la pronocicepción inducida por la naloxona y una disminución de la antinocicepción producida por la morfina. (Fig. 23, C).

Phe¹Ψ más morfina o dinorfina

Con la administración combinada de dosis bajas de Phe¹Ψ (100 ng/g) con morfina (1000 ng/g) o dinorfina A₁₋₁₇ (1 ng/g), compuestos que produjeron antinocicepción, se obtuvo un incremento significativo de la latencia a la conducta termnociceptiva comparado con el efecto producido por Phe¹Ψ, morfina o dinorfina A₁₋₁₇ individualmente o bien comparada con respecto al grupo control (Las latencias de cada grupo se compararon con un análisis de varianza Kruskal-Wallis y una prueba de Tukey (*p<0.05) (Fig. 23, D).

Radioinmunoanálisis

Curva de titulación.

El porcentaje de unión del anticuerpo anti-N/OFQ con el trazador ^{125}I N/OFQ se determinó con una curva de titulación. La dilución con la que se obtuvo el 22 % de especificidad del trazador ^{125}I N/OFQ (10000 cpm) con el anticuerpo anti-N/OFQ fue de 1:1500. Esta dilución se utilizó para la realización de la curva estándar y el radioinmunoensayo (Fig. 24 y 25).

Con el anticuerpo a una dilución de 1:1500 se pudieron detectar de concentraciones en el rango picomolar. La cuantificación se realizó con 40 ganglios nerviosos periesofágicos del caracol. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Contenido de N/OFQ inmunorreactiva en los ganglios periesofágicos del *H. aspersa*

Estructura	IR- N/OFQ pmol/mg prot.	IR- N/OFQ pmol/g de tejido.
Cerebroides	1.666 ± 0.52387445	2.3972 ± 0.1937
Subesofágicos	3.566 ± 0.7535103	5.3535 ± 1.5619

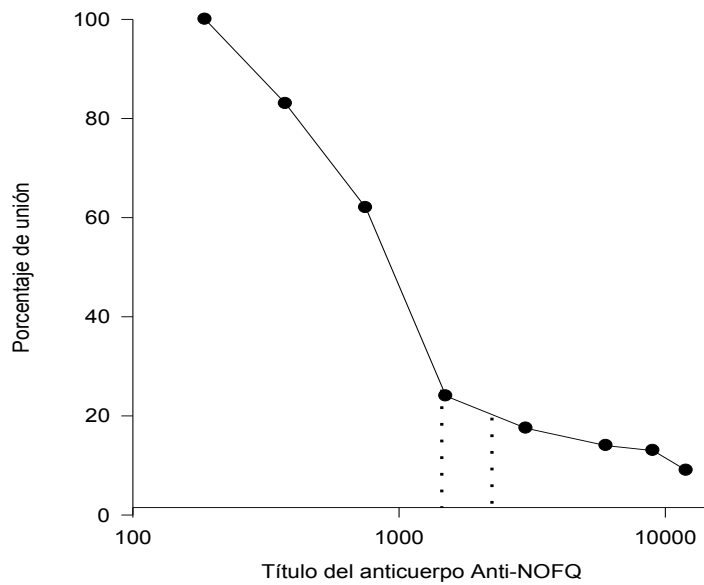


Figura 24. Curva de titulación del anticuerpo anti-nociceptina/orfanina FQ con el péptido N/OFQ marcado con I^{125} .

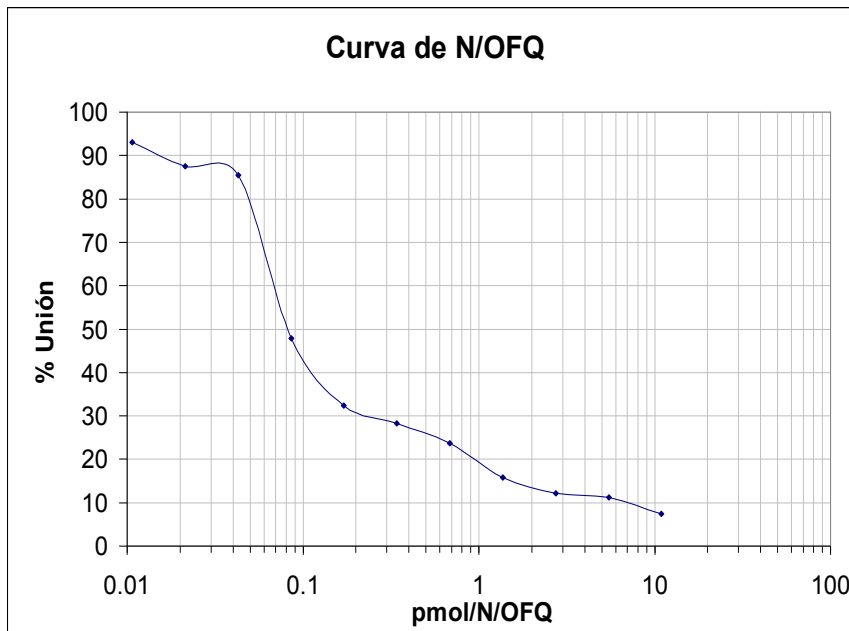


Figura 25. Curva estándar. Se muestran los valores del porcentaje de unión (eje de las ordenadas) del trazador ^{125}I N/OFQ con el anticuerpo anti-N/OFQ, a concentraciones progresivas de N/OFQ (eje de las abscisas, en escala logarítmica).

DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de este estudio fueron, la demostración de la existencia de inmunorreactividad a N/OFQ en los ganglios periesofágicos del caracol *Helix aspersa* con una distribución anatómica amplia, lo cual sugiere la participación de N/OFQ en múltiples funciones en este organismo. Describimos la localización subcelular de este péptido y las características morfológicas de las células que lo contienen. Demostramos que la N/OFQ en estos ganglios tiene una concentración similar a la reportada para otros péptidos opioides y que si bien se distribuye en las mismas regiones que las encefalinas no se producen en las mismas neuronas, es decir no hay colocalización. Observamos también que la administración de este péptido sintético tiene un efecto pronociceptivo, efecto que va en el mismo sentido que el efecto reportado en los mamíferos.

Para llevar a cabo los estudios inmunohistoquímicos y de radioinmunoensayo (RIA), verificamos previamente la especificidad de los anticuerpos anti-N/OFQ con un ensayo de inmunodot en donde se observó que los anticuerpos utilizados (C1 y C5) reconocen únicamente a su péptido sintético específico y no presentan reactividad cruzada con otros péptidos tales como Leu y Met encefalinas, dinorfina A₁₋₁₇, β -endorfina, nocistatina y sustancia P (Figs. 8 y 9). Estos resultados fueron similares a los reportados para el anticuerpo C1 por Gutiérrez y col. (2001). En el tejido, los controles para la inmunohistoquímica como la preadsorción del anticuerpo primario con su péptido sintético específico dieron como resultado la desaparición total de la inmunorreactividad. En la preadsorción con diferentes péptidos como dinorfina A₁₋₁₇,

Met y Leu-encefalinas, β -endorfina, y sustancia P, la inmunorreactividad no se altera. Con estos resultados se comprobó que los anticuerpos para N/OFQ utilizados son altamente específicos y reconocen al péptido endógeno en *H. aspersa*.

Demostramos la presencia de inmunorreactividad a N/OFQ en neuronas y fibras de todos los ganglios del anillo periesofágico, con excepción de los ganglios pleurales que solo contienen FIR abundantes en el neuropilo. Las FIR también se localizaron en el tejido conectivo periganglionar, perineurio, en los nervios, en las paredes de los senos hemolinfáticos de los ganglios nerviosos y en la pared aórtica del *Helix aspersa*. Observamos NIR pequeñas (7 a 39 μm), medianas (40 a 79 μm) y grandes (80 a 200 μm) de acuerdo a la clasificación descrita por Kerkut et al, (1975) y Elekes y Nassel, (1990). En los ganglios cerebroides (procerebro, mesocerebro y postcerebro; nomenclatura descrita por Bullock y Horridge, 1965) la mayoría de las NIR encontradas fueron pequeñas, mientras que en los ganglios subesofágicos (parietales, pedales y visceral), el tamaño las NIR fue variado (de pequeñas a grandes).

Ganglios Cerebroides

Procerebro

En el procerebro las NIR fueron de dos tipos: neuronas globulares pequeñas, que se localizaron alrededor de las fibras que forman los nervios tentaculares y neuronas con diámetro de entre 17 y 22 μm , con gran cantidad de gránulos, localizadas en la porción dorsolateral. Los grupos de Gelperin (1990) y Chase (2000) reportaron que la función principal de los tentáculos y del procerebro es la integración de la

información olfativa. En los mamíferos el receptor NOP y la N/OFQ se localizan en las regiones olfatorias, como el núcleo olfatorio anterior (Antón et al., 1996; Neal et al., 1999). Xu y col., (2007) reportaron que la N/OFQ puede incrementar la actividad de la sintasa del óxido nítrico neuronal en ratas (nNOS). Nuestro grupo reportó la presencia de actividad de la nNOS en fibras y neuronas del procerebro del caracol *H. aspersa* (Sánchez et al., 1994). Gelperin (1994) estudió el papel del óxido nítrico en los procesos olfatorios en interneuronas localizadas en el procerebro de moluscos, midiendo el incremento de la frecuencia oscilatoria en el procerebro por liberación de óxido nítrico, y encontró que la N/OFQ y el óxido nítrico actúan de manera conjunta en la nocicepción. El grupo de Xu (1996), demostró que dosis bajas de N/OFQ en la médula espinal tienen un efecto pronociceptivo vía la activación de los receptores NMDA y la subsecuente formación de óxido nítrico por la nNOS. La N/OFQ incrementó de manera dosis dependiente la actividad de la NADPH-diaforasa en la médula espinal de ratón. La presencia de N/OFQ así como la presencia de óxido nítrico en neuronas del procerebro y en fibras inmunorreactivas en el nervio tentacular sugiere que podría haber una posible participación de la N/OFQ y del óxido nítrico en el procesamiento de la información olfatoria y nociceptiva en este molusco.

Las características morfológicas de las neuronas dorsolaterales del procerebro corresponden a neuronas neuroendocrinas con gran cantidad de gránulos en los que está contenida la N/OFQ. A nivel de microscopía electrónica se observaron imágenes sugestivas de liberación paracrina, además de sináptica, ya que se encuentra en axones que presentan sinapsis en el neuropilo. Estas neuronas están situadas en la periferia de áreas hemolinfáticas. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la N/OFQ se libera de dos maneras, una a nivel de las sinapsis localizadas en el neuropilo y otra

de tipo paracrino o endocrino en el intersticio celular o hacia los senos hemólinfáticos, este tipo de liberación se ha reportado en neuronas de *Lymnaea stagnalis* (Roubos y Van Der Wal-divendal, 1980). Wijdenes y colaboradores (1980), estudiaron el sistema neuroendocrino de tres especies de caracoles pulmonados terrestres con el método de tinción alcian azul/ alcian amarillo (Wendelaar Bonga 1970) y las clasificaron como células cerebrales neuroendocrinas de tipo verde claro (cerebral light green cells, CeLGC). Sin embargo, no se habían descrito las características morfológicas de estas neuronas dorsolaterales en el *H. aspersa*. Se ha propuesto que las CeLGC producen hormona del crecimiento (Wijdenes et al., 1980) y tienen un efecto inhibitorio sobre las células de los cuerpos dorsales que producen hormonas gonadotrópicas (Wijdenes et al., 1987). Nosotros encontramos fibras IR-N/OAQ en los cuerpos dorsales que son un grupo de células situadas en el tejido conectivo de los ganglios cerebroides en su parte dorsal y rodean a la comisura cerebral. Estos hallazgos sugieren que la N/OAQ puede tener un papel en la regulación de la hormona de crecimiento y sobre las células que producen hormonas gonadotrópicas.

Mesocerebro

En el mesocerebro existen neuronas que contienen y liberan diferentes hormonas y neuropéptidos que regulan la conducta de apareamiento (Koene et al., 2000; Wijdenes et al., 1980; Gomot y Gomot, 1995). Nosotros encontramos fibras con varicosidades, inmunorreactivas a N/OAQ rodeando a las neuronas del mesocerebro izquierdo y un grupo de neuronas pequeñas inmunorreactivas localizadas en la parte lateral de los mesocerebros (izquierdo y derecho). Diferentes grupos de investigación reportaron que la administración de N/OAQ en la eminencia media de ratas, estimula la

secreción de prolactina y de hormona de crecimiento (Bryant et al., 1998; Netti et al., 2002; Kraska et al., 2005). En *H. aspersa* la presencia de fibras IR-N/OFQ que rodean a estas células neuroendocrinas sugiere que la N/OFQ puede participar en la regulación de las hormonas secretadas por el mesocerebro en el caracol *H. aspersa*. Otra de las funciones que tiene la N/OFQ es su participación en la ingesta de alimentos. Cuando se administra N/OFQ via i.c.v. a dosis de 10nM se incrementa la ingesta en ratas (Stratford et al., 1997). En el caracol *H. aspersa*, el grupo de Attia (1998) observó que las células CeLGC presentan un incremento en la coloración (alcian azul, alcian amarillo), cuando los caracoles tienen una mayor actividad locomotora y de alimentación. En *Lymnaea stagnalis* la serotonina tiene un papel importante en la regulación de la alimentación (Dyakonova et al., 1995). El grupo de neuronas IR-N/OFQ de la parte lateral del mesocerebro, están estrechamente relacionadas a neuronas serotoninérgicas, entre ellas la neurona gigante C3 (Cottrell et al., 1983; Prescott et al., 1997; Zakharov et al., 1982), lo que podría sugerir la participación de la N/OFQ en la regulación de la serotonina. Scklicker y Morani, (2000), reportaron que la N/OFQ inhibe la liberación de neurotransmisores como la serotonina, dopamina, noradrenalina y glutamato, en cortes de cerebro de rata y cobayo. La relación morfológica de estos grupos neuronales da la posibilidad de que la N/OFQ tenga un papel en la regulación de neurotransmisores en *H. aspersa* similar a la descrita en mamíferos (Scklicker y Morani., 2000).

Postcerebro

En el postcerebro se localiza la neurona serotoninérgica C3. Esta neurona tiene como función la retracción del tentáculo y la alimentación (Cottrell et al., 1983; Prescott et al., 1997; Zakharov et al., 1982). Las neuronas del postcerebro son las responsables

de la iniciación y modulación del movimiento motor de la alimentación y envían axones por el nervio cerebrobucal a los ganglios bucales (Delaney et al., 1994; Gelperin, 1994; Chase, 2000; Lerusalimsky y Balaban., 2005). En el postcerebro encontramos cuatro grupos de neuronas IR-N/OAQ localizadas en la cercanía de los nervios bucales y de los nervios cerebropleural y cerebropedal. La presencia de neuronas y la alta densidad de fibras inmunorreactivas a N/OAQ sugiere que esta pudiera participar en la modulación de las funciones del postcerebro en el *H. aspersa*.

Ganglios Subesofágicos

Los ganglios subesofágicos regulan diversas funciones cardio-renales, de la alimentación, respiración y locomoción (Balaban, 1979; S-Rózsa, 1979; S-Rózsa y Zhuravlev 1981; Moroz y Winlow 1992). El grupo de S-Rózsa (1979) demostró que los grupos de células localizadas en el ganglio visceral y en el parietal derecho regulan el sistema cardio-renal y digestivo en *H. pomatia*. Otra de las funciones de las neuronas del ganglio parietal es la apertura y cierre del neumostoma y la contracción muscular para la alimentación en los caracoles acuáticos (Balaban, 1979; S-Rózsa y Zhuravlev 1981). Los neurotransmisores como la serotonina y la dopamina participan en el movimiento respiratorio (Syed y Winlow, 1991), la dopamina facilita la apertura del neumostoma y la serotonina incrementa la frecuencia respiratoria (Moroz y Winlow 1992). La serotonina también interviene en la alimentación (Weiss et al., 1980) y en la modulación de sistemas motores incluyendo la locomoción pedal, el reflejo de la cola y de las branquias en moluscos acuáticos (Kupfermann et al., 1970; Mackey y Carew., 1983; Trudeau y Castelluci., 1992) y el nado en *Aplysia* (McPherson y Blankenship 1991). En los ganglios subesofágicos (pedales, parietales y visceral), nosotros

encontramos inmunorreactividad a N/OFQ en neuronas pseudomonopolares de entre 25 a 80 μm y en fibras del neuropilo que van hacia los diferentes nervios. La presencia de N/OFQ en estos ganglios sugiere que este opioide participa en la regulación de las diferentes funciones de estos ganglios regulando a la dopamina y a la serotonina, como lo hace en los mamíferos (Scklicker y Morani., 2000). En la pared aórtica y en el tejido conectivo periganglionar del caracol encontramos FIR a N/OFQ lo que sugiere la participación de la N/OFQ en la dinámica vascular de manera similar a como demostró el grupo de Czapla (1997), al observar un efecto vasodilatador e hipotensor en la rata.

Una evidencia importante sobre la existencia de la N/OFQ en moluscos es el trabajo realizado por Saunders y col., (2000). Ellos aislaron y clonaron del sistema nervioso central del molusco *L. stagnalis* 4 genes del receptor a N/OFQ (Lym-orph-1-4) los cuales presentan una gran homología al del receptor a N/OFQ de mamíferos. Los genes del receptor en *L. stagnalis* se localizan en células gigantes cerebrales, que modulan la conducta de alimentación y aprendizaje. También se observó expresión en células amarillo pálido (light yellow cells) que inervan fibras musculares de la uretra y están involucradas en diversas conductas como la copulación y la alimentación y en células amarillas (yellow cells) que regulan la presión sanguínea. En los ganglios parietales, las células amarillas y amarillo pálidas regulan el control hídrico. Estos procesos fisiológicos también se encuentran regulados por la N/OFQ en los mamíferos (Czapla et al., 1997; Kapusta et al., 2005). El hallazgo de múltiples células inmunorreactivas a N/OFQ en los ganglios parietales del *H. aspersa* y la evidencia sobre la existencia del receptor a N/OFQ en *L. stagnalis* sugiere la participación de la N/OFQ en el control hídrico y la alimentación.

La distribución de la inmunorreactividad a N/OFQ en los ganglios periesofágicos del caracol fue muy parecida a la distribución de las encefalinas (León-Olea y col., 2007) por lo que decidimos llevar a cabo estudios de doble marcaje N/OFQ- encefalinas y un análisis con microscopía confocal para ver su probable colocalización. Nuestros resultados mostraron que estos péptidos están en las mismas regiones pero no en las mismas neuronas ni en las mismas fibras. Gintzler (1997), reporta que la N/OFQ incrementa la liberación de encefalinas y nosotros en los estudios de termonocicepción encontramos que la N/OFQ puede actuar como un sistema antiopioide, crítico en la modulación de la nocicepción, como se discutirá más adelante (Mogil et al., 1996a; Grisel et al., 1998; Jhamandas et al., 1998; King et al., 1998; Kotlinska et al., 2000; Li et al., 2004; Chen et al., 2007; Scoto et al., 2007; Miller et al., 2008).

Termonocicepción

El primer paso en los experimentos de termonocicepción, fue estandarizar la prueba de la plancha caliente con el caracol *H. aspersa*, bajo las condiciones de nuestro laboratorio. Se llevaron a cabo experimentos piloto con temperaturas de 35 a 47 °C, resultando como la temperatura óptima de la plancha para la presentación de la conducta la de $45 \pm .5$ °C. La conducta consistió en la elevación de la parte anterior del pie y retracción de la cabeza hacia la concha. Esta conducta se presentó en todos los caracoles activos y con la cuantificación de la latencia a la presentación de la conducta se pudo diferenciar entre el efecto pronociceptivo y antinociceptivo. La duración de la latencia basal promedio fue de 5.5 s. Nuestros resultados mostraron que la administración de N/OFQ en el hemocele del caracol *H. aspersa* tiene un efecto pronociceptivo dosis dependiente, con una disminución de alrededor del 50 % en la

duración de la latencia basal a los 30 min postinyección. La administración del pseudopéptido Phe¹Ψ, que actúa como un antagonista del receptor NOP, produce un efecto antinociceptivo. Con la administración de morfina, dinorfina A₁₋₁₇ y naloxona pudimos comprobar que el caracol es un buen modelo para el estudio de los péptidos opioides ya que la morfina y la dinorfina A₁₋₁₇ producen un efecto antinociceptivo y la naloxona un efecto pronocicepción como se esperaba. El efecto de la nociceptina a nivel celular es inhibitorio igual que los opioides clásicos, ya que al unirse a su receptor inhibe la actividad de la adenilato ciclasa y la permeabilidad al calcio extracelular y aumentan la permeabilidad al potasio, (Grandy, 1996; Connor et al., 1996; Pan y Hirakawa, 2000). Nuestro grupo observó que la aplicación de N/OFQ 10 μM *in vitro* en neuronas de los ganglios cerebral y parietal registradas intracelularmente, produce un efecto similar excitatorio (22%) o inhibitorio (33%) de las neuronas registradas. Este hecho puede deberse a que no necesariamente se registraron neuronas que expresaran receptores NOP. Es probable que el efecto excitatorio sea secundario a la desinhibición de la neurona registrada y el efecto inhibitorio se de en neuronas que si expresan el receptor NOP (León-Olea et al., 2001). El efecto pronociceptivo de la N/OFQ encontrado en el presente estudio esta de acuerdo a lo obtenido en el caracol *Cepaea nemoralis* (Kavaliers y Perrot-Sinal, 1996) y es análogo a lo reportado en roedores después de la administración i.c.v. de 10 μg de N/OFQ (Reinscheid et al., 1995; Meunier et al., 1995). El grupo de Rossi (1996) reportó que la aplicación de N/OFQ (10 μg) en ratas produce un efecto bifásico que consiste en un efecto pronociceptivo temprano observado a los 15 min post-inyección y uno antinociceptivo tardío a los 60 min después de la inyección, en ratas probadas en experimentos de “tail-

flick". En nuestro estudio solo se presentó el efecto pronociceptivo registrado hasta los 60 min después de la administración, incluso con la dosis más alta probada (30 ng/g).

Se ha reportado que la administración de N/OFQ i.c.v. produce una reducción de la actividad locomotora en ratas a dosis de entre 0.1 y 10 nM (Devine et al., 1996), mientras que en ratones la administración i.c.v. de 10 ng estimula la actividad locomotora (Florin et al., 1996). Murphy y Maidment (1996) y Schlicker y Morari (2000) muestran que la N/OFQ reduce la liberación de dopamina en el sistema dopaminérgico del mesencéfalo, modificando con esto la actividad motora. En nuestro estudio no se cuantificó propositivamente la actividad locomotora; sin embargo, no observamos efectos motores aparentes con las dosis administradas (1–30 ng).

El efecto antinociceptivo producido por el pseudopéptido Phe¹Ψ no se había investigado antes en los moluscos. Hay varios estudios en roedores que muestran que la administración i.c.v. produce una respuesta pronociceptiva mientras que la administración i.t. produce antinocicepción en la prueba de presión de la cola (Calo et al., 1998; Wang et al., 1999; Candeletti et al., 2000). De acuerdo con el efecto antinociceptivo del Phe¹Ψ encontrado por nosotros, Carpenter y Dickenson (1998) encontraron que este pseudopéptido inhibe la actividad evocada por dolor de las fibras C, pero no la respuesta evocada por estimulación de las fibras beta en la medula espinal de la rata. El pseudopéptido Phe¹Ψ se clasificó como un antagonista competitivo del receptor NOP en el íleon de cobayo y en el conducto deferente de la rata (Guerrini et al., 1998). Sin embargo, se ha propuesto también que actúa como un antagonista parcial (Okawa et al., 1999) o como un agonista del receptor NOP (Butour et al., 1998; Bertorelli et al., 1999; Calo et al., 1998; Grisel et al., 1998; Yakimova y Pierau, 1999; Wang et al., 1999). Se ha propuesto que un factor relevante para el tipo

de efecto producido por el Phe¹Ψ es el número de receptores NOP que se expresan en las preparaciones experimentales. Cuando hay niveles bajos de receptores el Phe¹Ψ puede funcionar como antagonista, sin embargo cuando la preparación tiene niveles altos del receptor puede funcionar como agonista parcial (Olianas et al., 1999; Toll et al., 1999). Una hipótesis alternativa sugiere que los efectos diferentes del Phe¹Ψ y la N/OFQ dependen de la heterogeneidad del receptor NOP (Mathis et al., 1997). La diversidad de efectos observados con ambos compuestos sugiere que la actividad funcional del receptor NOP y sus ligandos dependen fuertemente del tipo de preparación y de la prueba utilizada en la caracterización farmacológica (Calo et al., 1998, 2000; Meis y Pape, 1998; Xu et al., 1998; Okawa et al., 1999; Yakimova y Pierau, 1999; Candeletti et al., 2000). En nuestro trabajo el Phe¹Ψ mostró un efecto opuesto a la N/OFQ y fue capaz de bloquear el efecto pronociceptivo de la N/OFQ en los experimentos de interacción. Estos resultados sugieren que el Phe¹Ψ actúa como un antagonista del receptor NOP en el *H. aspersa*.

Al igual que los efectos conocidos del sistema opioide clásico, nuestros resultados mostraron que la administración de morfina y dinorfina A₁₋₁₇ en *H. aspersa* produce un incremento significativo en la duración de la latencia a la presentación de la conducta termonociceptiva y la naloxona la disminuye. La co-administración de naloxona y morfina resultó en el bloqueo del efecto antinociceptivo del agonista. Estos datos mostraron que en *H. aspersa* los efectos sobre la nocicepción de los opioides clásicos descritos en especies más complejas se reflejan adecuadamente. Nuestros resultados están de acuerdo con reportes previos en los cuales, se describen respuestas similares a estos compuestos en el caracol *C. nemoralis* y (Kavaliers y Hirst, 1983 a y b; Kavaliers y Perrot-Sinal, 1996; Dyakonova et al., 1995).

La comparación del efecto pronociceptivo de la N/OFQ y la naloxona reveló que ambos compuestos producen un efecto similar pero la N/OFQ llega antes a su efecto máximo y es aproximadamente 30 veces más potente que la naloxona. En el análisis de las curvas dosis-respuesta ajustadas se demostró que el efecto antinociceptivo de la Phe¹Ψ, la dinorfina A₁₋₁₇ y la morfina, tienen una eficacia similar pero la Phe¹Ψ presenta su efecto máximo más rápidamente y su efecto es más prolongado que la dinorfina A₁₋₁₇ o la morfina. En relación a su potencia, la Phe¹Ψ es aproximadamente 50 veces menos potente que la dinorfina A₁₋₁₇, pero 30 veces más potente que la morfina. Es importante mencionar que la potencia relativa de los compuestos antinociceptivos no se había determinado en otros estudios en moluscos.

Varios grupos demostraron que Phe¹Ψ y N/OFQ no se unen con alta afinidad a los receptores opioides clásicos, únicamente al receptor NOP (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995; Guerrini et al., 1998; Nicholson et al., 1998; Reinscheid et al., 1998; Xu et al., 1998). La morfina no es un agonista opioide selectivo, así como la naloxona no es un antagonista selectivo y la dinorfina A₁₋₁₇ es un agonista del receptor opioide κ. Basados en los diferentes receptores en donde estos compuestos ejercen sus efectos, se ha propuesto que N/OFQ y Phe¹Ψ actúan a través de un sistema paralelo llamado sistema antiopioide (Mogil et al., 1996a; Grisel et al., 1998; Jhamandas et al., 1998; King et al., 1998; Kotlinska et al., 2000; Li et al., 2004; Chen et al., 2007; Scoto et al., 2007). En *H. aspersa* tanto el sistema opioide clásico, como el sistema antiopioide tienen una participación clara y crítica en la modulación de la nocicepción. Con los experimentos diseñados para ver la relación entre estos dos sistemas obtuvimos resultados interesantes. La interacción de N/OFQ con morfina o dinorfina A₁₋₁₇ resulta en una reducción marcada del efecto antinociceptivo de estos por la acción

pronociceptiva de la N/OFQ. En ratas, el péptido N/OFQ inhibe el efecto antinociceptivo de la morfina y bloquea el efecto antinociceptivo producido por otros agonistas de los receptores opioides μ , δ y κ (Mogil et al., 1996 a y b; Morgan et al., 1997; Grisel et al., 1998; King et al., 1998; Kotlinska et al., 2000, 2004; Li et al., 2004). En los experimentos de Rossi y colaboradores (1997), se reportó que la administración de N/OFQ vía i.c.v. (10 μ g) provoca un efecto pronociceptivo, seguido de un efecto antinociceptivo en pruebas de “tail-flick”. El efecto pronociceptivo no se afectó por la administración de agonistas de los receptores opioides, pero el efecto antinociceptivo se bloqueó con la naloxona. Con estos datos, los autores sugieren que la N/OFQ puede producir la liberación de opioides o actúa sobre un subtipo de receptor no conocido (Rossi et al., 1996; Mogil et al., 1996a; Gintzler et al., 1997; Jhamandas et al., 1998, Di Giannuario et al., 1999). El grupo de Kavaliers (1997) reportó que la administración del antagonista a NMDA, el NPC 1262, reduce el efecto pronociceptivo de la N/OFQ en el caracol *C. nemoralis* de manera dosis dependiente. Esto indica que los receptores NMDA pueden contribuir al efecto anti-opioide de la N/OFQ.

Por otro lado, cuando se combinaron dosis bajas del pseudopéptido Phe¹ Ψ con morfina o dinorfina A₁₋₁₇, se produjo un efecto fuerte antinociceptivo similar, por lo menos, a la suma aritmética de los efectos individuales de los fármacos. El hecho de que dos compuestos que actúan en diferentes tipos de receptores produzcan un efecto aditivo o supra-aditivo, abre la posibilidad de usar dosis bajas de cada droga para obtener una antinocicepción efectiva, reduciendo los efectos adversos producidos por altas dosis de los compuestos individuales (Hernández-Delgadillo y Cruz, 2004). La Phe¹ Ψ incrementa el efecto de la morfina y la dinorfina A₁₋₁₇ mientras que la N/OFQ bloquea su efecto. Sin embargo ni Phe¹ Ψ , ni N/OFQ actúan a través de los receptores

opioides clásicos. Con base en esto, nuestros resultados se pueden explicar por un antagonismo o agonismo fisiológico respectivamente. Se ha propuesto que la N/OFQ actúa como un péptido endógeno antiopioide a nivel supra espinal en ratas (Mogil et al., 1996a; Grisel et al., 1998; Jhamandas et al., 1998; King et al., 1998; Chen et al., 2007; Scoto et al., 2007). Algunos reportes muestran que N/OFQ bloquea la analgesia producida por la morfina en roedores (Morgan et al., 1997; Zhu et al., 1997; Li et al., 2004; Chen et al., 2001, 2007). Los datos obtenidos en nuestra serie de experimentos no nos permiten establecer que otro sistema de neurotransmisor o neurotransmisores están involucrados en los efectos que producen la N/OFQ y el Phe¹Ψ. Los datos reportados por de Kavaliers y col., (1997) en *C. nemoralis* muestran que el sistema NMDA pudiera estar involucrado en la producción del efecto antiopioide de la N/OFQ; sin embargo, en el *H. aspersa*; esto, tendría que comprobarse.

Cuando analizamos los efectos de la administración combinada de dosis subefectivas de naloxona y N/OFQ, compuestos que producen un efecto pronociceptivo, encontramos una reducción significativa en la latencia a la respuesta al estímulo nociceptivo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Lutfy y Maidment (2000) en ratas, en los que la combinación de N/OFQ y naloxona induce una respuesta pronociceptiva mayor a la respuesta producida por cada compuesto individual. Otra vez, en esta interacción sinérgica parece estar involucrado un sistema paralelo antiopioide.

Radioinmunoanálisis

Las áreas que presentan mayor intensidad de inmunorreactividad a N/OFQ en mamíferos son el hipotálamo y la médula espinal (Neal et al., 1999). En el hipotálamo de ratón hay una concentración de N/OFQ de 10.1 ± 1.6 pmol/g y en una sección de 2

cm de médula espinal de ratón hay 0.05 ± 0.012 pmol. de N/OFQ cuantificados por radioinmunoensayo (Quigley et al., 1998). Como comparación los niveles de β -endorfina en hipotálamo y médula espinal son de 0.15 ± 0.04 pmol/hipotálamo y 0.19 ± 0.07 pmol/2 cm/médula espinal. Con estos datos la concentración de N/OFQ encontrada en los ganglios periesofágicos del caracol es similar a la encontrada en el hipotálamo de ratón ya que en el ganglio total hay una concentración de 7.6972 ± 1.75 pmol/g y mayor a la de una sección de 2 cm de médula espinal de ratón.

La cuantificación de la inmunorreactividad de N/OFQ por radioinmunoanálisis en los ganglios cerebroides fue de 2.4 ± 0.1937 y en los subesofágicos de 5.4 ± 1.5619 pmol/g de tejido del caracol *H. aspersa*.

En el caso de otros péptidos opioides como son las encefalinas en los ganglios periesofágicos del *H. aspersa* la concentración de encefalinas tiene una variación circanual. Se reportó que la concentración de Met-encefalina en primavera es de 3.61 pmol/g y en invierno de 15.17 pmol/g de tejido en los ganglios cerebroides y en los subesofágicos de 3.38 pmol/g y 5.01 pmol/g, respectivamente. La Leu-encefalina en primavera fue de 97.54 pmol/g y en invierno 106.44 pmol/g en los cerebroides y de 121.13 en primavera y 26.46 pmol/g en invierno en los subesofágicos (Gutiérrez y Asai., 1991). Nuestro grupo reportó que la liberación de encefalinas (entre marzo y abril medida entre 11 a 13 h.) es de 23 ± 4 pmol/g/10 min para Met-encefalina (n=9) y de 5.56 ± 1.5 pmol/g/10 min para Leu-encefalina (n=7). Si comparamos la concentración de N/OFQ con la de encefalinas en extractos y liberada de los ganglios del caracol, encontramos que es similar a la de Met-encefalina y menor a la de Leu-encefalina. Nosotros no encontramos una variación estacional en la intensidad de la

inmunorreactividad a N/OFQ en los diferentes experimentos de inmunohistoquímica realizados durante el año en contraste con lo reportado para las encefalinas (León-Olea y col, 1991) por lo que la cuantificación por RIA se llevó a cabo en diciembre como única medición. Sería de interés hacer un estudio orientado a examinar si la N/OFQ presenta una variación diurna o estacional relacionada a algún evento como en el periodo reproductivo del caracol.

En conclusión, la N/OFQ en el caracol *H. aspersa* juega un papel en la regulación de la nocicepción administrada exógenamente, dando una rápida respuesta termonociceptiva. El antagonista del receptor NOP, Phe¹Ψ, en este modelo experimental induce un efecto antinociceptivo similar al de los agonistas opioides y bloquea el efecto pronociceptivo de la N/OFQ. Los dos compuestos actúan a través de un sistema paralelo antiopioide.

En conjunto, la identificación y la distribución anatómica de la N/OFQ en el sistema nervioso, así como la respuesta electrofisiológica de las neuronas expuestas a este péptido (León-Olea et al., 2001) y los efectos de la N/OFQ y el pseudopéptido Phe¹Ψ en la termonocicepción, definen al *H. aspersa* como un valioso modelo experimental para continuar el estudio evolutivo de estos sistemas opioides, así como para realizar estudios sobre la identificación y aislamiento del precursor de la N/OFQ.

CONCLUSIONES

- Demostramos la existencia de inmunorreactividad a nociceptina/orfanina FQ en los ganglios periesofágicos del caracol *Helix aspersa*.

-La inmunorreactividad a N/OFQ en los ganglios nerviosos periesofágicos del caracol tiene una distribución anatómica amplia y se encuentra en neuronas aisladas o en grupos, así como en fibras del neuropilo.

-A nivel de microscopía electrónica la inmunocitoquímica reveló que la localización subcelular de la inmunorreactividad a N/OFQ fue en vesículas densas localizadas en el citoplasma y en fibras neuronales.

-El procerebro contiene células con características neuroendocrinas inmunorreactivas a N/OFQ. Las sinapsis en el neuropilo del ganglio, así como las imágenes que sugieren liberación a espacios intercelulares y hemolinfáticos de vesículas marcadas observadas en la microscopía electrónica, sugieren dos tipos de liberación de la N/OFQ una a nivel sináptico y otra de tipo paracrino.

-A nivel de microscopia confocal se demostró que la inmunorreactividad a N/OFQ y a encefalinas tiene una distribución anatómica regional similar, pero no existe colocalización en las neuronas ni en fibras de los diferentes ganglios.

-Los experimentos de termnocicepción nos permitieron sugerir que el sistema N/OFQ/NOP participa en la regulación de la termnocicepción en *H. aspersa* y permite la comparación de la eficacia y la potencia de los compuestos opioides clásicos y los involucrados en el sistema N/OFQ/NOP. Los experimentos de interacción sugieren que estas dos clases de opioides juegan un papel importante en la regulación de la nocicepción a través de un sistema paralelo e introduce al *H. aspersa* como un modelo interesante para el estudio evolutivo de estos sistemas opioides.

-La cuantificación de la N/OFQ por radioinmunoensayo mostró una cantidad de N/OFQ en el rango picomolar con una concentración similar a la del hipotálamo y mayor a la de la médula espinal de ratón.

BIBLIOGRAFIA

- Antón B., Fein J., To T., Li X., Silberstein L., Evans C.J.J. Immunohistochemical localization of ORL-1 in the Central Nervous System of the rat. *Comp Neurol.* 368:229-251. 1996.
- Attia J., Blanc A., Hassnaoui M., Rehalia M.B. A Neurosecretory Phenomenon in Some Cerebral Nervous Cells of the Land Snail. *Biological Rhythm Research.* 29:329–342. 1998
- Balaban P.M. A system of command neurons in snail's escape behavior. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 39(2):97-107. 1979.
- Barnes R.D., *Zoología de los invertebrados.* Ed. Interamericana. Cuarta edición. 1987.
- Bertorelli R., Corradini L., Rafiq K., Tupper J., Calò G., Ongini E. Nociceptin and the ORL-1 ligand [Phe¹psi (CH₂-NH)Gly²]nociceptin(1-13)NH₂ exert anti-opioid effects in the Freund's adjuvant-induced arthritic rat model of chronic pain. *Br J Pharmacol.* 128(6):1252-8. 1999.
- Bryant W., Janik J., Baumann M., Callahan P. Orphanin FQ stimulates prolactin and growth hormone release in male and female rats. *Brain Res.* 807(1-2):228-33. 1998.
- Bullock T.H. Mollusca: Gastropoda. In *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrate*, voll, Bullock TH, Horridge GA (eds) WH Freeman, San Francisco, pp. 1283-1386. 1965.
- Bunzow J.R., Saez C., Mortrud M., Bouvier C., Williams J., Low M., Grandy D. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a δ or κ opioid receptor type. *FEBS Lett.* 347: 284-288. 1994.
- Burmeister M.A., Ansonoff M.A., Pintar J.E., Kapusta D.R. Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ)-evoked bradycardia, hypotension, and diuresis are absent in N/OFQ peptide (NOP) receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 326(3):897-904. 2008
- Butour J-L., Moisand CH., Mollereau C., Meunier J-C. Phe¹y(CH₂-NH)Gly²)Nociceptina(1-13)NH₂ is an agonist of the nociceptin (ORL1) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 349: R5-R6. 1998.
- Calo G., Guerrini R., Bigoni R., Rizzi A., Bianchi C., Regoli D., Salvadori S. Structure-activity study of the nociceptin (1-13)NH₂ N-terminal tetrapeptide and discovery of a nociceptin receptor antagonist. *J Med Chem.* 41, 3360-3366. 1998.
- Calo G., Guerrini R., Bigoni R., Rizzi A., Marzola G., Okawa H., Bianchi C., Lambert D., Salvadori S., Regoli D. Characterization of Nphe¹nociceptin (1-13)NH₂ a new selective nociceptin receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 129:1183-1193. 2000.

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.

Calo G., Rizzi A., Rizzi D., Bigoni R., Guerrini R., Marzola G., Marti M., McDonald J., Morari M., Lambert D.G., Salvadori S., Regoli D. [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH₂, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Br J Pharmacol.* 136(2):303-11. 2002.

Candeletti S., Guerrini R., Calo G., Romualdi P., Ferri S. Supraspinal and spinal effects of [Phe1psi(CH₂-NH)Gly₂]nociceptin(1-13)-NH₂ on nociception in the rat. *Life Sci.* 66: 257-264. 2000.

Carpenter K.J., Dickenson A.H. Evidence that [Phe1 psi(CH₂-NH)Gly₂]nociceptin-(1-13)-NH₂, a peripheral ORL-1 receptor antagonist, acts as an agonist in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol.* 125:949-951. 1998.

Chase R. Structure and Funtion in the Cerebral Ganglion. *Mycroscopy Reserch and Technique.* 49:511-520. 2000.

Champion H.C., Kadowitz P.J., Nociceptin an endogenous ligand for the ORL1 receptor, has novel hypotensive activity in the rat. *Life Sci.* 60(16):PL 241-5. 1997.

Chase R and Ratte S. Morphology of interneurons in the procerebrum of the snail *Helix aspersa.* *J Comp Neurol.* 384(3):359-72. 1997.

Chen Y., Fan Y., Liu J., Mestek A., Tian M., Kozak C.A., Yu L. Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett.* 347: 279-283.1994.

Chen X., Geller E.B., Adler M.W. Nociceptin/orphanin FQ blocks the antinociception induced by mu, kappa and delta opioid agonists on the cold water tail-flick test. *Eur J Pharmacol.* 557(1):32-6. 2007.

Chen X., McClatchy D.B., Geller E.B., Liu-Chen L., Tallarida R.J., Adler M.W. Possible mechanism of hypothermia induced by intracerebroventricular injection of orphanin FQ/nociceptin. *Brain Res.* 904(2):252-8. 2001.

Chu X., Xu N., Li P., Wang J.Q. The nociceptin receptor-mediated inhibition of the rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro. *Eur J Pharmacol.* 364(1):49-53. 1999.

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.

Connor M., Vaughan C. W., Chieng B., Chistie M. J. Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurones in vitro. *Neuron.* 119:1614-1618, 1996.

Constentin J., Florin S., Suaudeau C., Meunier J-C. Le clonage de la prénociceptine fait découvrir d'autres peptides biologiquement actifs. C. R. Soc. Biol. 192:1099-1209. 1998.

Coons A. H. Labelled antigens and antibodies. Annu Rev. Microbiol. 8:333-52, 1954

Cottrell G.A., Schot L.P., Dockray G.J. Nature. Identification and probable role of a single neurone containing the neuropeptide Helix FMRFamide. 304(5927):638-640. 1983.

Czapla M., Champion H., Kadowitz P. Nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, has vasodilator activity in the hindquarters vascular bed of the rat. Peptides. 18 (6):793-795. 1997.

Danielson P.B., Dores R.M. Molecular evolution of the opioid/orphanin gene family. Gen Comp Endocrinol. 113(2):169-86. 1999.

Darland T., Heiniricher M., Grandy D. Orphanin FQ/nociceptin: a role in pain and analgesia, but so much more. Trend Neurosci.21:215-221. 1998.

Dawon-Basoa M., Gintzler A. Nociceptin (Orphanin FQ) abolishes gestational and ovarian sex steroid-induced antinociception and induces hyperalgesia. Brain Res. 750:48-52, 1997.

Delaney K.R., Gelperin A., Fee M.S., Flores J.A., Gervais R., Tank D.W., Kleinfeld D. Waves and stimulus-modulated dynamics in an oscillating olfactory network. Proc Natl Acad Sci. 91(2):669-73. 1994.

Devine P., Taylor L., Reinscheid R., Monsma F., Civelli O., Akil H. Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. Neuro Res. 21(11):1387-1396, 1996.

Di Chiara G., North R.A. Neurobiology of opiate abuse. Trends Pharmacol Sci. 13(5):185-93. 1992.

Di Giannuario., Pieretti S., Catalani., Loizzo A. Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis in rats. Neurosci. Lett. 272:187-186, 1999.

Dyakonova V., Carlberg M., Sakharov D., Elofsson R. Anatomical Basis for Interactions of Enkephalin With Other Transmitters in The CNS of a Snail. Jour. Comp. Neur. 361:38-47. 1995.

Elekes K., Nassel D.R. Distribution of FMRFamide-like immunoreactive neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. Cell Tissue Res. 262:177-190. 1990.

Evans C. J., Keith Jr. D.E., Morrison H., Magendzo K., Edwards R. H. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. Science, 258:1952-1955. 1992.

Florin S., Suaudeau C., Meunier J-C., Costentin J. Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. *Eur J Pharmacol.* 317:9-13. 1996.

Fukuda K., Kato S., Mori K., Nishi M., Takeshima H., Iwabw N., Miyata T., Houtani T., Sugimoto T. CDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett.* 343:42-46. 1994.

Ge Z.J., Li C., Zhang L.C., Zeng Y.M., Cao J.L., Dai T.J., Wang J.K., Cui G.X., Tan Y.F., Zhao Y.P., Liu G.J. Involvement of local orphanin FQ in the development of analgesic tolerance induced by morphine microinjections into the dorsal raphe nucleus of rats. *Neurosci Lett.* 413(3):233-7. 2007.

Gelperin A. Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature.* 369(6475):61-3. 1994.

Gelperin A., Tank D.W. Odour-modulated collective network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature.* 345:437-440. 1990.

Gibaldi M. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics. Compartmental and noncompartmental pharmacokinetics.* 4th ed. Kent: Croydon Road Beckenham (UK). 1991.

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.

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.

Griebel G., Perrault G., Sanger D. Orphanin FQ, a novel neuropeptide with anti-stress-like activity. *Brain Res.* 836:221-224. 1999.

Grisel J.E., Farrier D.E., Wilson S.G., Mogil J.S. [Phe¹psi(CH₂-NH)Gly²]nociceptin-(1-13)-NH₂ acts as an agonist of the orphanin FQ/nociceptin receptor in vivo. *Eur J Pharmacol.* 357: R1-3. 1998.

Grisel J., Mogil J., Belknap J., Grandy D. Orphanin FQ acts as a supraspinal, but not spinal anti-opioid peptide. *Neuroreport.* 7:2125-2129. 1996.

Gomot A and Gomot L. Brain grafts of cerebral ganglia have effectiveness in growth restoration of damages *Helix aspersa* mesocerebrum. *Brain Research.* 682:127-132. 1995.

Grandy D.K. 27th Meeting of Internatl. Narcot Res. Conf. (INRC) Abstr. 29:S3-3. Long Beach, CA. July, 1996.

Guerrini R., Calo G., Rizzi A., Bigoni R., Bianchi C., Salvadori S., Regoli D. B. A new selective antagonist of the nociceptin receptor. *Jour. Of Pharmacol.* 123:163-165. 1998.

Gunduz O., Sipos F., Spagnolo B., Kocsis L., Magyar A., Orosz G., Borsodi A., Calo G., Benyhe S. In vitro binding and functional studies of Ac-RYYRIK-ol and its derivatives, novel partial agonists of the nociceptin/orphanin F/Q receptor. *Neurosignals*. 15(2):91-101. 2007.

Gutierrez R., Asai M. IR-Met and IR-leu-enkephalin content in the perioesophageal ganglia of *Helix aspersa* seasonal variations. *Comp Biochem Physiol C*. 100(3):609-13. 1991.

Gutierrez R., Leff P., Romo-Parra H., Acevedo R., Anton B. Orphanin-FQ/Nociceptin inhibits kindling epileptogenesis and enhances hippocampal feed-forward inhibition. *Neuroscience*. 105(2):325-33. 2001.

Hanstrom B. Uber die sogenannten Intelligenzphasen des Molluskengehirns und die Inervation des Tentakels von *Helix*. *Acta Zool. Stochk*. 6:183-215. 1925.

Hashimoto Y., Calo G., Guerrini R., Smith G., Lambert D.G. Antagonistic effects of Nphe¹nociceptin (1-13)NH₂ on nociceptin receptor mediated inhibition of cAMP formation in Chinese hamster ovary cells stably expressing the recombinant human nociceptin receptor. *Neurosci Lett*. 278(1-2):109-12. 2000.

Harlow, E., Lane D. *Antibodies a Laboratory Manual*. Vol. 1 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , NY. 1988

Hernadi L. Topographic organization of Efferent Neurons With Different Neurochemical Characters in the Cerebral Ganglia of the Snail *Helix pomatia*. *Microscopy Research and Technique*. 49:521-533. 2000.

Hernadi L., Elekes K. Topographic organization of serotonergic and dopaminergic neurons in the cerebral ganglia and their peripheral projection patterns in the head areas of the snail *Helix pomatia* *J Comp Neurol*. 411(2):274-87. 1999.

Hernádi L., Erdélyi L., Hiripi L., Elekes K. The organization of serotonin-, dopamine-, and FMRFamide-containing neuronal elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail *Helix pomatia*. *J Neurocytol*. 27(10):761-75. 1998.

Hernández-Delgadillo G.P., Cruz S.L. Dipyrone potentiates morphine-induced antinociception in dipyrone-treated and morphine-tolerant rats. *Eur J Pharmacol*. 502(1-2):67-73. 2004.

Hiramatsu M., Miwa M., Hashimoto K., Kawai S., Nomura N. Nociceptin/orphanin FQ reverses mecamylamine-induced learning and memory impairment as well as decrease in hippocampal acetylcholine release in the rat. *Brain Res*. 1195:96-103. 2008.

Hockfield S., Carlson S., Evans C., Levit P., Pintar J., Silberstein. *Molecular probes of the Nervous System*. Vol. 1 New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1993.

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.

Jenck F., Moreau J., Martin J., Kilpatrick G., Reinscheid R., Monsma F., Nothacker H., Civelli O. Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proc Natl Acad Sci.* 94:14854-14858. 1997.

Jenck F., Wichmann J., Dautzenberg F., Moreau J., Ouagazzal A., Martin J., Lundstrom 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.* 97:4938-4943. 2000.

Jhamandas K., Sutak M., Henderson G. Antinociceptive and morphine modulatory actions of spinal orphanin FQ. *Can J Pharmacol* 76:314-324. 1998.

Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H., Noda H., Marimato Y., Hirose T., Asai M. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neoendorphin-dynorphin precursor. *Nature.* 289:245-249. 1982.

Kapusta D.R., Burmeister M.A., Calo G., Guerrini R., Gottlieb H.B., Kenigs V.A. Functional selectivity of nociceptin/orphanin FQ peptide receptor partial agonists on cardiovascular and renal function. *J Pharmacol Exp Ther.* 314(2):643-51. 2005.

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.

Kaufmann W., Kerschbaum H.H., Hauser-Kronberger C., Hacker G.W., Hermann A. Distribution and seasonal variation of vasoactive intestinal (VIP)-like peptides in the nervous system of *Helix pomatia*. *Brain Res.* 695(2):125-36. 1995.

Kavaliers M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain. Res. Bull.* 21:923-932. 1988a.

Kavaliers M., Choleris E., Saucier D.M. The NMDA receptor antagonist, NPC 12626, reduces the pronociceptive effects of orphanin FQ and kappa opiate antinociception in the land snail, *Cepaea nemoralis*. *Peptides.* 18(7):943-7. 1997.

Kavaliers M., Hirst M. Tolerance to morphine-induced thermal response in the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. *Neuropharmacology.* 22:1321-1326. 1983a.

Kavaliers M., Hirst M., Teskey G.C. A functional role for an opiate system in snail thermal behavior. *Science.* 220:99-101. 1983b.

Kavaliers M. Innes D.G.L. Male scent-induced analgesia in the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. Involvement of benzodiazepine system. *Physiology and Behavior*. 42:131-135, 1988b.

Kavaliers M and Perrot-Sinal T.S. Pronociceptive Effects of the Neuropeptide, Nociceptin, in the Land Snail, *Cepaea nemoralis*. *Peptides*. 17:763-768. 1996.

Kerkut G.A., Lambert D.C., Gayton R.J., Loker J. E., Walker R.J. Mapping of Nerve Cells in the subsophageal ganglion of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 50:1-25. 1975.

Kieffer B., Befort K., Gavériaux-Ruff., Hirth C.H. The delta-opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:12048-12052. 1992 .

King M., Chang A., Pasternak G.W. Functional blockade of opioid analgesia by orphanin FQ/nociceptin. *Biochem Pharmacol.* 55:1537-40. 1998.

Koene J.M., Jansen R.F., Ter Maat A., Chase R. A conserved location for the central nervous system control of mating behaviour in gastropod molluscs: evidence from a terrestrial snail. *J Exp Biol.* 203(Pt 6):1071-80. 2000.

Kotlinska J., Dylag T., Rafalski P., Talarek S., Kosior M., Silberring J. Influence of nociceptin(1-17) fragments and its tyrosine-substituted derivative on morphine-withdrawal signs in rats. *Neuropeptides*. 38:277-82. 2004.

Kotlinska J., Suder P., Legowska A., Rolka K., Silberring J. Orphanin FQ/nociceptin inhibits morphine withdrawal. *Life Sci.*66:PL119-23. 2000.

Kôster A., Montkowski A., Schulz S., Stube E., Knautd K., Jenck F., Moreau J., Nothacker H., Civelli O., Reinscheid R. Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 96:10444-10449. 1999.

Kraska A., Bryant W., Murphree E., Callahan P., Janik J. Lack of involvement of dopamine and serotonin during the orphanin FQ/Nociceptin (OFQ/N)-induced prolactin secretory response. *Life Sci.* 77(13):1465-79. 2005.

Krowicki Z.K., Kapusta D.R. Tonic nociceptinergic inputs to neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus contribute to sympathetic vasomotor tone and water and electrolyte homeostasis in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 317(1):446-53. 2006.

Kupfermann I., Castellucci V., Pinsker H., Kandel E.R. Neuronal correlates of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*. 167:1743-1745. 1970.

Lachowitz J. E., Shen Y., Monsma F.J., Sibley D.R. Molecular cloning of a novel G protein-coupled related to the opiate receptor family. *J Neurochem.* 64:34-40. 1995.

Leff P., Martinez J., 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 methods. <http://www.methodsfinder.org>. 1999.

León-Olea M. Los péptidos opioides y la filogenia de la nocicepción. *Ciencias*. 31:20-30, 1993.

León-Olea M., Sánchez-Alvares M., Briones M., Martínez-Servin M. Existencia de inmunorreactividad a Leu-encefalinas en neuronas de caracol de jardín *Helix aspersa*. Memorias del XXX Congreso Nal. De Ciencias Fisiol, Jalapa, Ver., 1987.

León-Olea M., Sánchez-Álvarez N., Camacho F., Alvarez-Leffmans F. Distirbutions and seasonal variations of the inmunorreactivity in the periesophageal ganglia of the snail *Helix aspersa*. Soc. Neurosc. 21ST Annual Meeting New Orleans. Abstr, K-3. 385-17. 1991.

León-Olea M., Miller-Pérez C., Cruz R., Antón B., Vega R., Soto E. Immunohistochemical localization and electrophysiological action of nociceptin/orphanin-FQ in the snail (*Helix aspersa*) neurons. *Neurosci Lett*. 316:141-144. 2001.

León-Olea M., Miller-Pérez C., Mendoza-Sotelo J., Antín B., Sánchez-Islas E. Distribución anatómica de la nociceptina/orfanina FQ y las encefalinas en los ganglios cerebroides del caracol *Helix aspersa*. Estudio con microscopia confocal y electronica. XXII Reunión Anual de Investigación. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. 3-5 de octubre. 2007.

León-Olea M., Sánchez-Álvarez M., Sánchez-Islas E. Los opioides como péptidos ancestrales: estudio inmunohistoquímico en el molusco *Helix aspersa* y el anfibio *Ambystoma mexicanum*. *Salud Mental*. 17(3):40-47. 1994.

Le Maitre E., Daubeuf F., Duterte-Boucher D., Costentin J., Leroux-Nicollet I. Coupling of ORL1 (NOP) receptor to G proteins is decreased in the nucleus accumbens of anxious relative to non-anxious mice. *Brain Res*. 1110(1):144-149. 2006.

Leroith D., Liotta A., Roch J., Shiloach J., Lewis M., Pert C., Kreiger D. Corticotropin and beta-endorphin like materials are native to unicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci*. 79:2086-2090. 1982.

Lerusalimsky V., Balaban P. Morphological basis for coordination of growth and reproduction processes in the CNS of two terrestrial snails. *Exp Brain Res*. 161(4):465-73. 2005

Leung P.S., Shaw C., Johnston C.F., Irvine G.B. Immunocytochemical distribution of neuropeptide F (NPF) in the gastropod mollusc, *Helix aspersa*, and in several other invertebrates. *Cell Tissue Res*. 275(2):383-93. 1994.

Li G., Chase R. Correlation of axon projections and peptide immunoreactivity in mesocerebral neurons of the snail *Helix aspersa*. *J Comp Neurol*. 353(1):9-17. 1995.

Li N., Wei S.Y., Yu L.C. Moriyama K, Mitchell J, Palmer PP. Role of nociceptin in the modulation of nociception in the arcuate nucleus of rats. *Brain Res*. 1025:67-74. 2004.

Lutty K., Maidment N.T. Blockade of mu-opioid receptors reveals the hyperalgesic effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat hot plate test. *Br J Pharmacol*. 131(8):1684-8. 2000.

Mackey S., Carew T.J. Locomotion in *Aplysia*: triggering by serotonin and modulation by bag cell extract. *J Neurosci*. 3(7):1469-77. 1983.

Maidment N.T., Braumbaugh D.R., Rudolph V., Erdelyi E., Evans C. Microdialysis of extracellular endogenous opioid peptides from rat brain in vitro. *Neuroscience*. 33:549-557. 1989.

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.

Marti M., Stocchi S., Paganini F., Mela F., De Risi C., Calo' G., Guerrini R., Barnes T.A., Lambert D.G., Beani L., Bianchi C., Morari M. Pharmacological profiles of presynaptic nociceptin/orphanin FQ receptors modulating 5-hydroxytryptamine and noradrenaline release in the rat neocortex. *Br J Pharmacol*. 138(1):91-8. 2003.

Mathis J.P., Ryan-Moro J., Chang A., Hom J.S., Scheinberg D.A., Pasternak G.W. Biochemical evidence for orphanin FQ/nociceptin receptor heterogeneity in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 230:462-465. 1997.

Meis S., Pape H. C. Postsynaptic mechanisms underlying responsiveness of amygdaloid neurons to nociceptin/orphanin FQ. *J Neurosci*. 18:8133-8144. 1998.

Meunier J-C., Mollereau C., Toll L., Saudeau C., Miosand. C., Avineaire P., Butour J. L., Guillemot J.C., Ferrara P., Monserrat B., Mazarguil H., Vassart G., Parmentier M., Costentin J. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*. 377:532-535. 1995.

Meunier J. Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor like ORL1 receptor. *Eur Jour Pharmacol*. 340:1-15. 1997.

Miller-Pérez C, Sánchez-Islas E, Pellicer F, Rodríguez-Manzo G, Cruz SL, León-Olea M. Role of nociceptin/orphanin FQ and the pseudopeptide [Phe1Psi(CH2NH)Gly2]-nociceptin(1-13)-NH2 and their interaction with classic opioids in the modulation of thermnociception in the land snail *Helix aspersa*. *Eur J Pharmacol*. 581(1-2):77-85. 2008.

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.

McPherson D.R., Blankenship J.E. Neural control of swimming in *Aplysia brasiliana*. III. Serotonergic modulatory neurons. *J Neurophysiol.* 66:1366-1379. 1991.

Mogil J., Grisel J., Belknap J., Grandy D., Reinscheid R., Civelli O. Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience.* 75:333-7. 1996a.

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.

Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Botour J., Moisand C., Chalon P., Caput D., Vassart G., Meunier J-C. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning functional expression and localization. *FEBS Lett.* 341:33-38, 1994.

Mollereau C., Simons M. J., Soularue P., Liners F., Vassart G., Meunier J.C., Parmentier M. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci.* 93(16):8666-70.1996.

Montiel J., Cornille F., Roques B., Noble F. nociceptin/Orphanin FQ metabolism: role of the aminopeptidase and endopeptidase 24.15. *J. Neurochem* 68(1):354-361. 1997.

Morgan M.M., Grisel J.E., Robbins C.S., Grandy, D. K. Antinociception mediated by the periaqueductal gray is attenuated by orphanin FQ. *Neuroreport.* 8:3431-3434. 1997.

Moroz L.L., Winlow W. Respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis*: pharmacological and cellular analyses. *Acta Biol Hung.* 43:421-429. 1992.

Murphy N., Ly T., Maidment N. Intracerebroventricular orphanin FQ/nociceptin suppresses dopamin release in the nucleo accumbens of anaesthetized rats. *Neuroscience.* 75:1-4. 1996.

Naiki D.R., Sar M., Stumpf W.W. Immunochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the lizard, *Anolis carolinensis*. *J. Comp. Neurol.* 198:583-601. 1981.

Nakanishi S., Inoue A., Kito T., Nakamura M., Chang C., Cohen U., Numa S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. *Nature.* 278:423-427. 1979.

Neal C.H.R., Mansour A., Reinscheid H-P.N. Civelli O., Watson S. Localization of Orphanin FQ (Nociceptin) Peptide and Messenger RNA in the Central Nervious System of the Rat. *Jour. Comp. Neurol.* 406:503-547. 1999.

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.

Nezlin L., Voronezhskaya E. GABA-immunoreactive neurones and interactions of GABA with serotonin and FMRFamide in a peripheral sensory ganglion of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res.* 772(1-2):217-25. 1997.

Nicholson J.R., Paterson S.J., Menzies J.R., Corbett A.D., McKnight A.T. Pharmacological studies on the "orphan" opioid receptor in central and peripheral sites. *Can J Physiol Pharmacol.* 76:304-313. 1998.

Ninkowic M., Hunt S.P., Emson P., Iversen L.L. The distribution of multiple opiate receptors in bovine brain. *Brain Res.* 214:163-167. 1981.

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.

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.

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.

Noda Y., Mamiya T., Manabe T., Nishi M., Takeshima H., Nabeshima T. Role of nociceptin systems in learning and memory. *Peptides.* 21(7):1063-9. 2000.

North R.A., Williams J.T., Surprenant A., Chistie M.J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:5487-5491. 1987.

Nothacker H.P., Reinscheid R.K., Mansour A., Henningsen R.A., Ardati A., Monsma F.J., Watson S.J., Civelli O. Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:8677-8682. 1996.

Okawa H., Nicol B., Bigoni R., Hirst R., Calo G., Guerrini R., Rowbotham D., Smart D., McKnight A., Lambert D. Comparison of the effects of Nphe¹nociceptin (1-13)NH₂ in rat brain, rat vas deferens and CHO cells expressing recombinant human nociceptin receptors. *Brit. Jour. Of Pharmacol.* 127:123-130. 1999.

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.* 395:286-289. 1998.

Olianas M.C., Maullu C., Ingianni A., Onali P. [Phe¹phi(CH₂-NH)Gly²]nociceptin-(1-13)-NH₂ acts as a partial agonist at ORL1 receptor endogenously expressed in mouse N1E-115 neuroblastoma cells. *Neuroreport*. 10(5):1127-31. 1999.

Osinski M.A., Brown R.D. Orphanin FQ/Nociceptin: a novel neuromodulator of gastrointestinal function? *Peptides*. 21:999-1005, 2000.

Pan Z.Z., Hirakawa N.A. cellular Mechanism for the Bidirectional Pain-Modulating Actions of Proorphanin FQ/Nociceptin. *Neuron*. 26: 515-522. 2000.

Peiser Ch., Udem B., Fischer A. Nociceptin effect in the airways. *Peptides*. 27:995-998. 2000.

Pellicer F., Asai M., León-Olea M., Sánchez-Alvarez M. In vitro release of immunoreactivity Met- and Leu- enkephalins in whole periesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 104c:323-325. 1993.

Prescott S.A., Gill N., Chase R. J *Neurophysiol.* Neural circuit mediating tentacle withdrawal in *Helix aspersa*, with specific reference to the competence of the motor neuron C3. 78(6):2951-65. 1997.

Quingley D., McDougall., 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.

Reinscheid R.K., Nothacker H-P., Bunzow J.R., Grandy D.K., Langen H., Monsma F. J. Jr., Civelli O. Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor. *Science*. 220:792-794. 1995.

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*.7(8):1369-1372. 1996.

Rizzi A., Rizzi D., Marzola G., Regoli D., Larsen B.D., Petersen J.S., Calo' G. Pharmacological characterization of the novel nociceptin/orphanin FQ receptor ligand, ZP120: in vitro and in vivo studies in mice. *Br J Pharmacol*. 37(3):369-74. 2002.

Roosendaal B., Lengvilas R., McGaugh J.L., Civelli O., Reinscheid R.K. Orphanin FQ/nociceptin interacts with the basolateral amygdala noradrenergic system in memory consolidation. *Learn Mem*. 14(1):29-35. 2007.

Rossi G., Leventhal L., Pasternak G. Naloxone sensitive orphanin FQ-induced analgesia in mice. *Eur J Pharmacol*. 311: R7-R8. 1996.

Rossi G.C., Leventhal L., Bolan E., Pasternak G.W. Pharmacological characterization of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *J Pharmacol Exp Ther*. 282:858-65. 1997.

Rossi G.C., Perlmutter M., Leventhal L., Talatti A., Pasternak G.W. Orphanin FQ/nociceptin analgesia in the rat. *Brain Res.* 792(2):327-30. 1998.

Roubos E.W., Van Der Wal-Divendal R.M. Ultrastructural analysis of peptide-hormone release by exocytosis. *Cell Tissue Res.* 207(2):267-75. 1980.

Saito Y., Maruyama K., Saido T., Seiichi K. 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.

Sakharov D., Nezlin L., Moroz L., Elofsson R. Patterns of enkephalin immunolabeling in the pulmonate snail *Cepaea nemoralis* and related molluscs. *Brain Res.* 20;620(1):114-21. 1993.

Sánchez-Álvarez M., León-Olea M., Talavera E., Pellicer F., Sáchez-Islas E., Martínez-Lorenzana G. Distribution of NADPH-diaphorase in the periesophageal ganglia of the snail, *Helix aspersa*. *Neurosci Lett.* 169(1-2):51-55. 1994.

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.

Santama N and Benjamin P. Gene Expression and Function of FMR/Famida-Related Neuropeptides in the Snail *Lymnaea*. *Microsc. Res. And Tech.* 49:547-556. 2000.

Saunders S. E., Burke J. F., Benjamin P. R., 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.* 12:2345-2353. 2000.

Schmalz E. Zur Morphologie des Nervensystems von *Helix pomatia*. *Z. Wiss. Zool.* 111:506-568. 1914.

Schlicker, E., Morari M., Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. *Peptides.* 21:1023-1029. 2000.

Schulz S., Schieff M., Nub D., Gramsch C., Hollt V. Nociceptin/orphanin FQ and opioid peptides show overlapping distribution but non co-localization in pain/modulatory brain regions. *Neuroreport.* 7:3021-3025, 1996.

Sim-Selley L.J., Vogt L.J., Childers S.R., Vogt B.A. Distribution of ORL-1 receptor binding and receptor-activated G-proteins in rat forebrain and their experimental localization in anterior cingulate cortex. *Neuropharmacology.* 45(2):220-30. 2003.

Simonds W. The molecular basis of opioid receptor function. *Endocr. Rev.* 9:200-12. 1988.

Scoto G.M., Aricò G., Ronsisvalle S., Parenti C. Blockade of the nociceptin/orphanin FQ/NOP receptor system in the rat ventrolateral periaqueductal gray potentiates DAMGO analgesia. *Peptides*. 28(7):1441-6. 2007.

S-Rózsa K., Zhuravlev V. Central regulation and coordination of the activity of cardio-renal system and pneumostoma in the subesophageal ganglia of *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem Physiol*. 69A:85-88. 1981.

S-Rózsa K. Analysis of the neural network regulation the cardio-renal system in the central nervous system of *Helix pomatia* L. *Am Zool* 19:117-128. 1979.

Stratford T., Holahan M., Kelley A. Injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake. *Neuroreport*. 8:423-426. 1997.

Syed N.I., Winlow W. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis* II. Neural elements of the central pattern generator CPG. *J Comp Physiol A*. 169:557-568. 1991.

Tian J., Xu W., Zhang W., Fang Y., Grisel J., Mogil J., Grandy D And Ji-Sheng Han: Involvement of endogenous Orphanin FQ in electroacupuncture-induced analgesia. *Neuroreport*. 8(2):497-500. 1997.

Toll L., Burnside J., Berzetei-Gurske I. Agonist activity of ORL1 antagonists is dependent upon receptor number. Abstract A89. INRC Conference, Garmisch-Partenkirchen. 1999.

Trudeau L.E., Castellucci V.F. Contribution of polysynaptic pathways in the mediation and plasticity of *Aplysia* gill and siphon withdrawal reflex: evidence for differential modulation. *J Neurosci*. 12:3838-3848. 1992.

Uchiyama H., Toda A., Hiranita T., Watanabe S., Eyanagi R. Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic-like effect of nociceptin/orphanin FQ in rats. *Neurosci Lett*. 431(1):66-70. 2008.

Uhl G.R., Childers S., Pasternak S. An opioid receptor gene family reunion. *Trends Neurosci*. 17:8993. 1994.

Vaccarino A.L., Olson G.A., Olson R.D., Kastin A.J. Endogenous opiates: 1998. *Peptides*, 20(12):1527-74. 1999.

Vanderah T., Raffa R., Lashbrook J., Burrit A., Hruby V., Frank P. Orphanin-FQ/nociceptin: lack of antinociceptive, hyperalgesic or allodynic effects in acute thermal or mechanical test following intracerebroventricular or intrathecal administration to mice or rats. *Eur J Pain* 2: 267-280. 1998.

Wang J.B., Johnson P.S., Persico A.M., Hawkins A.I., Griffin C.A., Uhl G.R. Human μ opiate receptor cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett*. 338:217-222. 1994.

- Wang Y.Q., Zhu C.B., Cao X.D., Wu G.C. Supraspinal hyperalgesia and spinal analgesia by [Phe¹ψ(CH₂-NH)Gly²]nociceptin-(1-13)-NH₂ in rat. *Eur J Pharmacol.* 376(3):R1-3. 1999
- Weiss K.R., Koch U.T., Koester J., Mandlbaum D.E., Kupfermann I. Neural and molecular mechanisms of food-induced arousal in *Aplysia californica*. In: Salánki J, editor. *Advances in physiological science, neurobiology of invertebrate*. Vol. 13. Oxford: Pergamon. P. 305-344. 1980.
- Wendelaar Bonga SE. Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 108(2):190-224. 1970.
- Wijdenes J., Minnen J., Boer H. A comparative study on neurosecretion demonstrated by the alcian blue-alcian yellow technique in three terrestrial pulmonates (Stylommatophora). *Cell Tissue Res.* 210:47-56. 1980.
- Wijdenes J., Schluter N.C., Gomot L., Boer H.H. In the snail *Helix aspersa* the gonadotropic hormone-producing dorsal bodies are under inhibitory nervous control of putative growth hormone-producing neuroendocrine cells. *Gen Comp Endocrinol.* 68(2):224-9. 1987.
- Wick M.J., Minnerath S.R., Liana X., Elde R., Lay P.Y., Loh H.H. Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa receptors opioid. *Mol Brain Res.* 27:37-44. 1994.
- 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.
- Xu L., Okuda-Ashitaka E., Matsumura S., Mabuchi T., Okamoto S., Sakimura K., Mishina M., Ito S. Signal pathways coupled to activation of neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord by nociceptin/orphanin FQ. *Neuropharmacology.* 52(5):1318-25. 2007.
- Xu I.S., Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X.J. Phe¹ψ(CH₂-NH)Gly²NC(1-17) NH₂, a proposed antagonist of the nociceptin receptor, is a potent and stable agonist in the rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 249, 127-130. 1998.
- Yakimova K.S., Pierau F.K. Effect of nociceptin and [Phe¹ψ(CH₂-NH) Gly²]-nociceptin-(1-13)-NH₂ on tonic activity of rat hypothalamic neurons. *Neurosci Lett.* 274(2):87-90. 1999.
- Yamamoto T., Nozaki-Takaguchi N., Sakashita Y., Kimura S. Nociceptin/orphanin FQ, role in nociceptive information processing. *Prog Neurobiol* 57:527-35. 1999.

Zakharov I.S., Lerusalimski V.N., Balaban P.M. Pedal serotonergic neurons modulate the synaptic input of withdrawal interneurons of *Helix aspersa*. *Invertebrate Neuroscience*. 1:41-52. 1995.

Zakharov I., Mats V. N., Balaban P. M. Role of the giant cerebral neurons in control of defensive behavior of *Helix aspersa* locorum (in Rusia). *Neirofiziologiya*. 14:353-358. *Transl Neurophysiol*. 1982.

Zhu C.B., Cao X.D., Xu S.F., Wu G.C. Orphanin FQ potentiates formalin-induced pain behavior and antagonizes morphine analgesia in rats. *Neurosci Lett*. 235(1-2):37-40. 1997.

ANEXO 1

Inmuno Dot para los antisuero C5 y C1

1. Se usaron membranas PVDF (Bio-Rad Laboratorios California U.S.A.) de 0.22 μm (tamaño del poro) y se marcaron en cuadrados de 1 X 1 cm.
2. Activar membrana con MetOH (marca Merck Darmstadt, Alemania) al 100% por 30 min a t.a, agitar y secar a t.a.
3. Colocar 3 μl de cada péptido en cada cuadro de la membrana (previamente disuelto en MetOH al 50 %, en PB 10mM pH 7.2). Usar diferentes concentraciones de trabajo.

Leu-enc	Met-enc	Din	N/OFG	β -E	Nocist	SP
10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}
10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}
10^{-12}	10^{-12}	10^{-12}	10^{-12}	10^{-12}	10^{-12}	10^{-12}

4. Quitar el exceso de MetOH en orden decreciente de concentración (40, 20, 10% MetOH/PB 10 mM), lavar con PB 10mM (5 min. cada lavado) con agitación constante a t.a.
5. Prebloquear las membranas con una solución de 0.3 % T-20 (Tween 20 marca, Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A), 3 % de gelatina de pescado (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A), 1% Leche baja en grasa (Svelty), en PB 10 mM con 0.09% de NaCl (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) pH 7.2; durante 1-1 ½ h, con agitación constante a t.a.

6. Incubar las membranas con los anticuerpos primarios rabbit anti-nciceptina/orfanina FQ (C1 y C5) en una dilución de trabajo de 1:100 para C1 y 1:150 para C5. Se diluyeron los anticuerpos en la misma solución de prebloqueo. Se incubaron a 4°C toda la noche con agitación constante.
7. Incubar por 1 h a t.a..
8. Lavar 2 veces con 0.3% Tween-20, 3% de gelatina de pescado, en PB por 15 min cada lavado con agitación constante.
9. Incubar el anticuerpo secundario HRP-burro anti-conejo en una dilución 1:2000 en 0.5% Tween-20, 3% de gelatina de pescado, 1% baja en grasa (Svelty), en PB, 10mM pH 7.2 durante 2 h, con agitación constante a t.a.
10. Lavar 2 veces con 0.1% Tween-20/PB 10mM 10 min cada lavado
11. Incubar durante 3 min en el complejo de quimioluminiscencia (solución A +Solución B 1:1) (marca Perkin Elmer LAS Inc Boston, MA. U.S.A.)
12. Eliminar el exceso.
13. Revelar en placa radiográfica con película Kodak X-Omat ultrasensible

Método ABC.

1. Bloquear la peroxidasa endógena en una solución 0.03% de H₂O₂ (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) en amortiguador de fosfatos salinos (PBS) 0.1M pH 7.4, 30 min a temperatura ambiente (t.a.).
2. Lavar en PBS (3 veces de 5 minutos cada uno).

- 3.** Bloquear los sitios de unión inespecífica, con una solución de bloqueo (albúmina sérica bovina 5% (ASB, marca Amersham Biosciences USA), suero normal de burro 5% (SNB, marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) y amortiguador de fosfatos salino con tritón X100 al 0.3% 0.1M pH 7.4 (PBS-T) durante 1 h a t.a.

- 4.** Incubar el primer anticuerpo (anti-nociceptina/orfanina FQ desarrollado en conejo) durante 24 horas a 4°C, diluido en solución de bloqueo (PBS-T, SNB 5% y ASB 5%,). Se llevaron a cabo experimentos con diferentes diluciones desde 1:10 hasta 1:2000. La dilución óptima del anticuerpo que fue de 1:150.

- 5.** Lavar (3 veces de 5 a 10 min. cada uno con PBS-T).

- 6.** Incubar el segundo anticuerpo (burro-anti-conejo biotinilado marca Jackson Immuno Research Lab. INC. West Grove Pennsylvania), a una dilución 1:50, en PBS-T, SNB 5% y ASB 5%, durante 2 h a t.a..

- 7.** Lavar con buffer PBS.

- 8.** Incubar con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, marca Vector laboratorios Burlingame U.S.A.) por 1h a t.a.

- 9.** Revelar la peroxidasa con la siguiente solución: PBS 1µM (26ml) diaminobenzidina tetrahidroclorinada (DAB, 10mg, marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A), H₂O₂ al 0.03% y sulfato de níquel al 0.03% (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A).

- 10.** Contrateñir las laminillas alternadamente con safranina acuosa al 0.02% (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) durante 5 s.

- 11.** Deshidratar en alcoholes de 70% 80% 90% 100% y Xilol.

12. Montar los cubreobjetos con resina entelan (marca Merck Darmstadt, Alemania) para su observación en el microscopio óptico de campo claro.

Inmunofluorescencia

1. Bloquear los sitios de unión inespecífica, con una solución de ASB 5 %, SNB 5 % y PBS-T (solución de bloqueo) durante 1 h a t.a.

2. Incubar el primer anticuerpo durante 48 h a 4°C (anti-nocieptina/orfanina FQ: 1:10, ó anti-dinorfina A₁₋₁₇ (marca Peninsula laboratorios Inc U.S.A.) encefalinas: 1:50 (marca Peninsula laboratorios Inc U.S.A.), en solución de bloqueo.

3. Lavar con buffer PBS.

4. Incubar el segundo anticuerpo (burro-anti-conejo fluoresceinado marca Jackson Immuno Research Lab. INC. West Grove Pennsylvania) a una dilución 1:50, en solución de bloqueo durante 2 h a 37°C.

5. Lavar con buffer PBS.

6. Montar con antifade (Molecular Probes Inc U.S.A.).

7. Observación y análisis en un microscopio de fluorescencia equipado con una lámpara de mercurio de 100 W y los filtros específicos para FITC o para TRITC.

Inmunofluorescencia de doble marcaje

1. Bloquear los sitios de unión inespecífica, con una solución de ASB 5 %, SNB 5 % y PBS-T (solución de bloqueo) durante 1 h a t.a.

2. Incubar los primeros anticuerpo durante 48 h a 4°C (anti-nocieptina/orfanina FQ: 1:10 hecho en conejo y anti- encefalinas 1:50 hecho en ratón), en solución de bloqueo.

3. Lavar con buffer PBS.

4. Incubar el segundo anticuerpo (burro-anti-conejo fluoresceinado marca Jackson Immuno Research Lab. INC. West Grove Pennsylvania y anti.ratón acoplado a rodamina marca Jackson Immuno Research Lab. INC. West Grove Pennsylvania) ambos anticuerpo a una dilución 1.:50, en PBS-T 0.3%, SNB 5% y ASB 5% durante 2 h a 37°C.

5. Lavar con buffer PBS.

6. Montar con antifade (Molecular Probes Inc U.S.A).

7. Observación y análisis en un microscopio de fluorescencia equipado con una lámpara de mercurio de 100 W y los filtros específicos para FITC o para TRITC.

Microscopía electrónica de transmisión

Inmunocitoquímica post-inclusión

1. Fijar los ganglios en paraformaldehido al 4% (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A), y ácido pícrico al 0.2% (Baker U.S.A.), 24 h en PBS 0.1M, pH 7.2.

2. Crioproteger de los ganglios en sacarosa (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A), al 30%.

3. Cortar los ganglios de 100µm en un vibratomo (Serie 1000).

5. Osmoficar en tetraóxido de osmio (marca Electron Microscopy Science Hatfield, Pa, U.S.A.) al 4% 40 min.

6. Lavar en PBS 0.2M pH 7.4, 3 veces por 5 min.
7. Deshidratar en alcoholes graduales de 70%, 80% y 96% y oxido de propileno (marca Electron Microscopy Science Hatfield, Pa, U.S.A.) durante 15 min, dos cambios en cada uno.
8. Preincluir en resina Epon Araldita (marca Electron Microscopy Science Hatfield, Pa, U.S.A.) 1:1 24 h.
9. Incluir en plano en resina Epon Araldita 5 días, dejando polimerizar a 50°C.
10. Seleccionar la zona del ganglio nervioso a estudiar para hacer el bloque y realizar cortes ultrafinos de 90 nm en un ultramicrotomo.

Inmunocitoquímica

1. Colocar las rejillas con los cortes en una solución saturada de metaperyodato de sodio (marca Merck Darmstadt, Alemania) durante 75 min a t. a.
2. Lavar con TBS 0.05M pH 7.6.
3. Bloquear con suero normal de cabra 1% (SNC, marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) albúmina sérica bovina 1% (ASB, marca Amersham Biosciences USA), en Tris buffer salino (TBS) 0.05M pH 7.6 1h.
4. Incubar el 1er anticuerpo anti-N/OFQ (C5) a una dilución de 1:150, durante 72 h, a 4°C.
5. Lavar con buffer TBS 0.05M pH 7.6 y TBS 0.05M pH 8.2.

6. Incubar el 2º anticuerpo anti-conejo conjugado a oro (10nm) % (marca Amersham Biosciences USA), a una dilución de 1:25. 3 h a temperatura ambiente (Diluir en TBS 0.05M pH 8.2).
7. Lavar con buffer-TBS 0.05M pH 7.6 (tres lavados de 5 min cada uno).
8. Lavar con agua bidestilada.
9. Contrastar con acetato de uranilo al 2% (marca Electron Microscopy Science Hatfield, Pa, U.S.A.) durante 5 min.
10. Lavar con agua desionizada.
11. Contrastar con citrato de plomo (marca Electron Microscopy Science Hatfield, Pa, U.S.A.) durante 6 min.
12. Lavar con agua destilada
13. La observación se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM 900 y se tomaron fotomicrografías para el análisis morfológico.

Radioinmunoanálisis.

1. Incubar los pozos recubiertos con proteína A (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) por 24 h a 4 °C
2. Incubar el anticuerpo primario anti-nociceptina/orfanina FQ (1:1500) diluido en solución buffer de RIA.
3. Lavar los pozos 4 veces por 2 min cada uno.

4. Preparar soluciones en buffer de RIA, con 10000 cuentas por min (cpm) de trazador, una dilución seriada (0.015, 0.030; 0.07; 0.15; 0.3; 0.6; 1.25, 2.5; 5.0; 10; 20 ng) de péptido competidor, la nociceptina/orfanina FQ sintética (Phoenix Pharmaceuticas, Inc, Belmont, U.S.A.) no marcada con ¹²⁵I.

5. Para los pozos control (curva estándar), adicionar 100 µl de cada una de las diluciones de nociceptina/orfanina FQ sintética no marcada más 20 µl del trazador radiactivo a cada pozo, realizar por triplicado. Para los pozos en los cuales se midió material inmunorreactivo a nociceptina/orfanina FQ de los extractos de péptido total crudo de tejido nervioso, adicionar los extractos peptídicos de tejido nervioso (cerebroides y subesofágicos) más 20 de trazador radiactivo a cada pozo. Incubar 24 h a 4 °C.

Realizar triplicados por cada condición experimental.

6. Aspirar la mezcla radiactiva de cada pozo y lavar 4 veces por 3 min con buffer de radioinmunoensayo a 4 °C para prevenir una posible disociación del complejo antígeno-anticuerpo.

7. Aspirar la última solución de lavado y se remover cada pozo del plato, para ponerlo en un tubo de vidrio para contar radiactividad en el contador gamma. En este nivel, determinar la cantidad de unión del antígeno radiactivo (trazador).

8. Construir una curva estándar con los ensayos control y calcular los valores de concentración inhibitoria del 50% de unión (IC50) para establecer el nivel mínimo confiable de detección de nociceptina/orfanina FQ sintética.

Técnica de Lowry para la cuantificación espectrofotométrica de proteínas. Curva Patrón.

La curva se prepara a partir de una solución acuosa de albúmina de suero de bovino (ASB) con una concentración de 1 mg/ml (Fig. a).

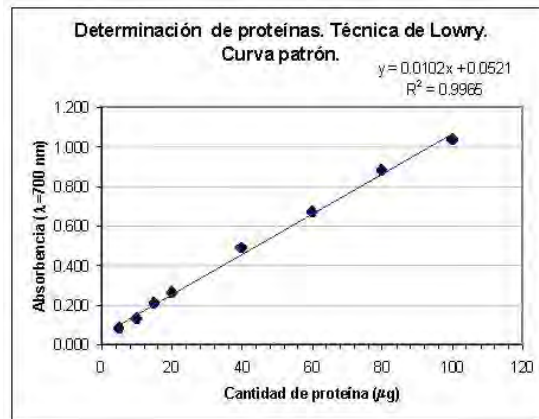


Figura a. Ejemplo de una curva patrón de ASB 1 mg/ml para la cuantificación de proteínas por la técnica de Lowry.

Determinación de proteínas por la técnica de Lowry.

1. NaOH (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) 0.4N
2. Albúmina serica bovina (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) 1mg/ml (ASB).
3. Reactivo A. Reactivo alcalino de cobre
 - a. Solución de Na_2CO_3 al 2% 0.1N (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) e hidroxido de sodio (25ml).
 - b. Solución de CuSO_4 al 1 % (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) (250µl)
 - c. Solución de tartrato de sodio y potasio al 2% (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) (250µl)

4. Reactivo B.

Folin-Ciocalteu (marca Sigma Aldrich, St Louis, MO, U.S.A) en proporción 1:1 con agua desionizada. Preparar el reactivo justo antes de agregarlo a los tubos. Cubrir de la luz ya que es fotosensible (Fig. b).

Técnica de Lowry											
	Reactivos	Curva estándar									Muestra
		Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Agua (µL)	150	145	140	135	130	110	90	70	50	140
B	BSA 1 mg/mL (µL)	0	5	10	15	20	40	60	80	100	---
C	Muestra (µL)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	10
Agregar los reactivos siguientes tanto a la curva como a las muestras											
D	NaOH (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
E	Reactivo A (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Agitar y esperar 15 minutos											
F	Reactivo B (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Volumen total = 1300 µL. Agitar inmediatamente después de adicionar el reactivo B. Esperar 30 min. Leer en el espectrofotómetro a $\lambda = 700 \text{ nm}$.											dgs

Figura b. Preparación de la curva patrón y de las muestras para determinar proteínas por la técnica de Lowry.

ANEXO 2

Los resultados obtenidos en este estudio fueron presentados en los siguientes congresos y reuniones:

León-Olea, M., Anton, B., Sánchez-Alvarez, M., **Miller-Pérez, C.**, Sánchez-Islas, E. Distribución anatómica del neuropéptido nociceptina en los ganglios periesofágicos del caracol *Helix aspersa*. XLI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A. C. San Luis Potosí, S.L.P., México, septiembre de 1998. Res. 0115.

Miller-Pérez, C., Sánchez-Islas, E., Antón B., León-Olea, M. Localización anatómica del neuropeptido nociceptina/orfanina FQ en los ganglios cerebroides del caracol *Helix aspersa*. XXII Congreso Nacional de Histología. Veracruz, Ver., México, 14-16 de octubre de 1998. Pag. 35-

Miller-Pérez Carolina., León Olea Martha. Distribución anatómica de la Nociceptina/Orfanina FQ en los ganglios nerviosos del caracol *Helix aspersa*. XIV Reunión de Investigación del Instituto Mexicano de Psiquiatría. 6, 7 y 8 de Octubre de 1999.

Miller-Pérez C., Bucio-Pacheco V., Mucio-Ramírez 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 Fisiológicas y XLIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C. Cancún, Quintana Roo. México, 3-7 de septiembre del 2000. Res. C96.

Miller-Pérez C., Sánchez-Islas E., Pellicer, F., Antón B., Mucio-Ramírez S., León-Olea M. Efecto de la nociceptina/orfanina FQ y el antagonista del ORL-1 sobre la termonocicepción en el caracol *Helix aspersa*. XV Reunión de Investigación y Enseñanza del Instituto Nacional de Psiquiatría. México D.F. 20-22 de octubre del 2000.

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.

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.

Miller-Pérez, C., Bucio V., Pellicer F., Mucio-Ramírez S., Sánchez-Islas E., León-Olea M. Antinociceptive Effects of the, Phe¹ Ψ (CH₂-NH)Gly² NC(1-13)NH₂ antagonist to ORL-1 in the land snail *Helix aspersa* thermnociception. 31Th Annual Meeting Society For Neuroscience 2001. San Diego Cal., *Neurosci. Abs.* 2101: November 10-15, 2001.

Miller-Perez Carolina., León Olea Martha. Estudio inmunohistoquímico de la Nociceptina/Orfanina FQ en el procerebro del caracol *Helix aspersa*. XVII Reunión de Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría. 28, 29 y 30 de octubre del 2002.

León-Olea M, **Miller-Pérez C**, Mendoza-Sotelo J., Anton B., Sánchez- Islas E. Distribution of the nociceptin/orphanin FQ in the procerebrum of the land snail *Helix aspersa*. Immunohistochemical and immunocytochemical study. Sixth IBRO World Congress of Neuroscience, abs. 3156 *Prague, Czech Republic*. July, 2003.

Miller-Pérez C., Mendoza-Sotelo J., Sánchez-Islas E., Antón B., León-Olea M. Localización ultraestructural de la nociceptina/orfanina FQ en el Procerebro del caracol *Helix aspersa*. XLVI Congreso SNCF. Aguascalientes, del 3 al 6 de agosto del 2003.

Miller-Pérez C., Antón B., León-Olea M. Contenido de nociceptina/orfanina FQ en los ganglios cerebroides y subesofágicos del caracol *Helix Aspersa*. XLVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Guadalajara, Jal. Res. C-063, del 4 al 8 de septiembre del 2005.

Miller-Pérez C., Antón B., León-Olea Martha¹. Cuantificación de nociceptina/orfanina FQ en los ganglios cerebroides y subesofágicos del caracol *Helix Aspersa*. XX Reunión anual de Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de Fuente. México D.F. 3-5 de octubre del 2005.

León-Olea M., **Miller-Pérez C.**, Mendoza-Sotelo J., Antón B., Sánchez-Islas E. Distribución anatómica de la Nociceptina/orfanina FQ y las encefalinas en los ganglios cerebroides del caracol *Helix Aspersa*. Estudio con microscopía confocal y electrónica. XXI Reunión anual de Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de Fuente Muñiz del 4-6 de octubre del 2006.

León-Olea M., **Miller-Pérez C.**, Mendoza-Sotelo J., Antón B., Sánchez-Islas E., Distribución anatómica de la Nociceptina/orfanina FQ y las encefalinas en los ganglios cerebroides del caracol *Helix Aspersa*. Estudio con microscopía confocal y electrónica. XLIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 4-8 de septiembre del 2006. Querétaro Queretaro

León Olea, M., **Miller-Pérez, C.**, Mendoza-Sotelo, J., Sánchez-Islas, E. Distribución anatómica de la nociceptina/orfanina FQ y en las encefalinas en los ganglios cerebroides del caracol *Helix aspersa*. Estudios con microscopía confocal

y electrónica. L Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Puebla. 11 de septiembre del 2007.

J. Mendoza-Sotelo, C. **Miller-Perez**, E. Sanchez-Islas, *M. Leon-Olea. Nociceptin/orphanin FQ and met-enkephalin in the cerebral ganglion of *Helix aspersa*. Immunohistochemical and immunocytochemical study. *Society for Neuroscience* 37th Annual Meeting Noviembre Nov. 4-7, San Diego Ca, USA, 2007.

Role of nociceptin/orphanin FQ and the pseudopeptide [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ and their interaction with classic opioids in the modulation of thermonociception in the land snail *Helix aspersa*

Carolina Miller-Pérez^a, Eduardo Sánchez-Islas^a, Francisco Pellicer^b, Gabriela Rodríguez-Manzo^c,
Silvia L. Cruz^c, Martha León-Olea^{a,*}

^a Laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan. México D.F., C.P. 14370, México

^b Laboratorio de Neurofisiología Integrativa, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan. México D.F., C.P. 14370, México

^c Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Sede Sur, Calzada de los Tenorios 235, Col. Granjas Coapa, Tlalpan. México D.F., C.P. 14330 D.F., México

Received 8 August 2007; received in revised form 15 November 2007; accepted 21 November 2007

Available online 21 December 2007

Abstract

The role in nociception of nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) and its receptor, the opioid receptor-like 1 (NOP), remains unclear because this peptide has been implicated in both suppression and enhancement of nociception. The present work characterises the effects of N/OFQ and the NOP receptor antagonist, the pseudopeptide [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ (Phe¹Ψ), on thermonociception in the snail *Helix aspersa* using the hot plate assay. Additionally, the possible interaction of each of these compounds with morphine or dynorphin A_{1–17} and naloxone was studied. Compounds were administered into the hemocoel cavity of *H. aspersa* and the latency to the aversive withdrawal behaviour recorded. Dose–response and time course curves were done. N/OFQ and naloxone produced a similar dose-dependent pronociceptive effect; however, N/OFQ reached its peak effect earlier and was 30 times more potent than naloxone. [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ and the opioid agonists, morphine and dynorphin A_{1–17} produced antinociception with a similar efficacy, but [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ reached its peak effect more rapidly and lasted longer than that of dynorphin A_{1–17} and morphine. [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ was 50 times less potent than dynorphin A_{1–17}, but 30 times more potent than morphine. N/OFQ significantly reduced morphine and dynorphin A_{1–17}-induced antinociception. Combined administration of low doses of [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ and morphine or dynorphin A_{1–17} produced a potent antinociceptive effect. Sub-effective doses of naloxone and N/OFQ also synergised to produce pronociception. Data suggest that these two opioid classes regulate nociception through parallel systems. The *H. aspersa* model appears as a valuable experimental preparation to continue the study of these opioid receptor systems.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Nociceptin/orphanin FQ; [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂; Opioid peptide; Thermonociception; Land snail; Antinociception; Invertebrates

1. Introduction

Since the cloning of the opioid receptor-like 1 (NOP) receptor and the discovery of its endogenous ligand, nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ), there has been interest in establishing the role played by this peptidergic system in the modulation of nociception (Bunzow et al., 1994; Chen et al., 1994; Fukuda

et al., 1994; Wang et al., 1994; Wick et al., 1994; Lachowitz et al., 1995; Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995; Meunier, 1997; Rossi et al., 1997; Pan et al., 2000).

There is controversial evidence with regard to N/OFQ effects, due to the fact that this peptide has been implicated in both the suppression and enhancement of nociception. The contradictions seem to stem from dose variations, route of administration and animal model used in different studies. For example, intracerebroventricular (i.c.v.) administration of N/OFQ to mice produced a pronociceptive response in the hot

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 55 32 32; fax: +52 55 56 55 99 80.

E-mail address: marthalo@imp.edu.mx (M. León-Olea).

plate test (Meunier et al., 1995; Meunier, 1997), and the tail-flick assay (Reinscheid et al., 1995), but intrathecal (i.t.) administration of this peptide produced antinociception in rats (Xu et al., 1996, 1998). According to Vanderah et al. (1998), neither i.t. nor i.c.v. administration of N/OFQ produced significant nociception in the hot plate, warm-water or radiant heat tail-flick tests in rats. However, N/OFQ (10 nmol) had an antinociceptive effect in the radiant heat tail-flick test in mice. Rossi et al. (1996) reported that i.c.v. administration of a high N/OFQ dose (10 µg) yielded an initial rapid pronociceptive effect followed by a delayed antinociceptive response in the tail-flick test in mice. While the pronociceptive component was insensitive to the administration of opioid receptor antagonists, antinociception was reversed by naloxone. The existing evidence is still not clear about the exact mechanisms of action regarding pro- or antinociceptive effects. The authors suggested that N/OFQ may produce a delayed activation of an opioid-mediated mechanism of action or that N/OFQ could interact with more than one receptor subtype (Rossi et al., 1996, 1998) or play a general role in opioid modulation (Mogil et al., 1996a,b; Gintzler et al., 1997; Di Giannuario et al., 1999).

[Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ was first described as a competitive N/OFQ antagonist by Guerrini and collaborators in 1998. Later on, other authors have provided evidence that [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ acts as a partial NOP receptor agonist in different experimental preparations (Butour et al., 1998; Chu et al., 1999; Olianas et al., 1999).

In order to gain some insight into the function of N/OFQ, [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ and the NOP receptor, simpler experimental approaches have been proposed to elucidate the controversial findings reported in mammalian models. In a previous study, our group reported the presence and distribution of N/OFQ immunoreactivity in neurons and fibres of the periesophageal ganglia of the land snail *Helix aspersa* and showed that the application of 10 µM N/OFQ produced a similar excitatory (22%) and inhibitory (33%) action in neurons of the cerebral or parietal ganglion (León-Olea et al., 2001). In invertebrates, opioid peptides participate in the modulation of sensory perception and antinociception related functions (Kavaliers, 1988; Pellicer et al., 1993; Dyakonova et al., 1995; Kavaliers and Perrot-Sinal, 1996; Zakharov et al., 1995; León-Olea, 2002). In the nervous system of land snails, some identified neurons responding to nociceptive stimuli have been related to neurons commanding the withdrawal behaviour elicited by aversive stimuli of different nature; i.e. tactile, thermal, chemical or by vibration (Zakharov et al., 1995). Molluscs display withdrawal behaviour, when subjected to a thermonociceptive stimulus, which is analogous to the one observed in rats and mice subjected to the hot plate test. The latency to this response is increased with opioid receptor agonists like morphine, enkephalins or dynorphin and this antinociceptive effect can be blocked by opioid receptor antagonists (Kavaliers and Hirst, 1983; Kavaliers, 1988; Dyakonova et al., 1995; Kavaliers and Perrot-Sinal, 1996).

The first objective of this work was to characterize the effects of the peptide N/OFQ and the pseudopeptide [Phe¹Ψ(CH₂NH)

Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ on the regulation of thermonociception in a land snail *H. aspersa*, in which the nervous system N/OFQ distribution is known. The second aim was to study the possible interaction of each of these compounds (N/OFQ and [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂) with morphine, dynorphin A_{1–17} and naloxone in thermonociception regulation.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Land snails *H. aspersa* (also named *Cantareus aspersus*) were collected from gardens in Mexico City. They were kept in acrylic chambers with a 10-cm thick humid soil layer and maintained under a 12 h/12 h light/dark cycle, at a temperature of 20±2 °C. Animals were daily hydrated and fed with lettuce and oats *ad libitum*, and room humidity was kept at 100%. Snails were housed under these conditions for at least 1 week prior to the experimental session. Experiments were performed according to NIH guidelines for care and use of laboratory animals and approved by the Project Commission of the Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

2.2. Chemicals

The compounds used in this study were: nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ, Phoenix Pharmaceuticals, INC., Belmont, CA; USA); [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ (Phoenix Pharmaceuticals, INC., Belmont, USA); naloxone hydrochloride (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), dynorphin A_{1–17} (Peninsula Lab, INC., Belmont, USA), and morphine sulphate (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). These compounds were diluted in 0.9% saline solution and injected into the snail's hemocoel cavity through the foot muscle with a micro syringe (Hamilton) to deliver a 20 µl volume.

2.3. Nociception evaluation

Preliminary experiments were run to determine the temperature at which snails displayed the withdrawal behaviour in a constant and quantifiable manner under our laboratory conditions. Independent groups of snails ($n=10$, each) were placed on the surface of a hot plate (Socrel, model D537) at temperatures ranging between 38 and 45 °C with step increases of 0.5 °C. All snails were allowed to fully hydrate before being tested. The land snails' withdrawal behaviour is generally described as a characteristic elevation of the anterior portion of the fully extended foot until it reaches its readily discernible maximum elevation (Kavaliers and Hirst, 1983; Kavaliers, 1988). In the present work, we found that retraction of the snail's head into the shell was a clearer, more constant response than the sole determination of the maximum elevation of the foot, therefore this retraction was considered as the behavioural end point of the withdrawal response (see Fig. 1).

The response latency (time interval elapsing between placing the snail on the surface of the hot plate until the presentation of withdrawal behaviour) was recorded at each temperature. Each

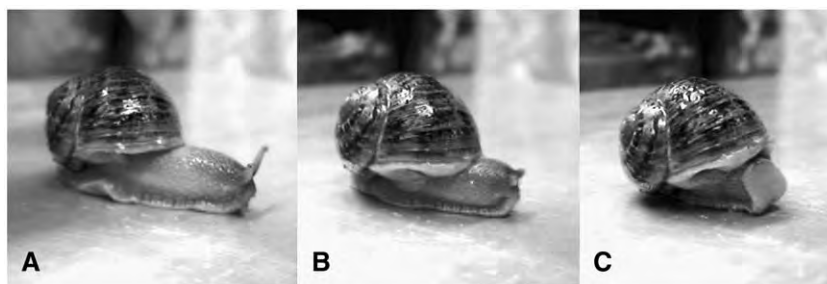


Fig. 1. Photograph sequence illustrating the withdrawal response exhibited by the land snail *Helix aspersa* when subjected to the hot plate test. A. Snail on the hot plate at time $t=0$; B. The snail begins retraction and rising of the foot; C. Snail's elevation of the fully extended anterior part of the foot and head retraction into the shell. This last response was considered as the end point of the withdrawal response.

snail was tested only once to avoid the release of endogenous opioids, due to a previous thermonociceptive stimulus, that could interfere with the evaluation of drug effects. The cut-off time was established at 30 s to avoid tissue damage. Behavioural assessments were performed during the morning (10:00 to 13:00 am). The observer recording the withdrawal response was blind to the treatments.

The results of these experiments showed that all snails exhibited response latencies between 5 and 7 s at 45 ± 0.5 °C. Since this basal latency allowed the evaluation of pronociceptive as well as antinociceptive drug effects, the aforementioned temperature level was used.

2.4. Experimental series

2.4.1. Dose and time–response curves

Independent groups of snails ($n=10$, each) were used to do time and dose–response curves for N/OFQ (1–30 ng/g), $[\text{Phe}^1\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)- NH_2 (30–560 ng/g), morphine (1000–10,000 ng/g), dynorphin A_{1-17} (1–5.6 ng/g) and naloxone (30–3000 ng/g). For each dose of every treatment, the drug was administered at time zero ($t=0$) and independent groups of snails were tested at each of the following post-injection times: 15, 30, 60, 90 or 120 min ($n=10$, each). The results observed served to identify the time at which the maximum effect was obtained, as well as the effective and sub-effective doses to be used in interaction experiments. Two control groups were initially established: naive (untreated animals) and vehicle injected (20 μl saline solution). Since no significant differences were found in the mean response latencies between both groups, the control groups of all experiments were saline-treated.

2.4.2. Interaction of N/OFQ with compounds that produced antinociception

In this experiment, N/OFQ (10 ng) was combined with $[\text{Phe}^1\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)- NH_2 (560 ng/g), dynorphin A_{1-17} (5.6 ng/g) or morphine (10,000 ng/g). For the first combined administration, $[\text{Phe}^1\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)- NH_2 was injected at $t=0$ followed by N/OFQ 15 min later. Snails were tested on the hot plate at 45 min post-injection, time at which both compounds exhibited their maximum effect. For the second combination, animals received dynorphin A_{1-17} (5.6 ng/g) and 30 min later, N/OFQ (10 ng/g). For the third combination, snails were injected with 10,000 ng/g morphine

and 30 min later, with N/OFQ (10 ng/g). These last two combination groups were tested on the hot plate 60 min after the first injection.

2.4.3. Interaction of N/OFQ with naloxone

A combined sub-effective dose of naloxone (100 ng/g) and N/OFQ (1 ng/g) at $t=0$ was administered to snails that were tested on the hot plate 30 min later, time at which the maximum effect of both compounds was obtained.

2.4.4. Interaction of morphine with naloxone

The prototypical interaction between morphine and naloxone in nociception control was also tested to establish the effective dose of each substance to counteract each others' effect in this preparation. The peak effect of naloxone was observed at 30 min post-injection, while that of morphine was achieved 60 min after its administration. To control for this temporal difference, the effect of the combined treatment of these compounds was tested 30 and 60 min after their administration. Thus, an effective dose of morphine (10,000 ng/g) together with a dose of 1000 ng/g naloxone were simultaneously injected to snails at $t=0$ that were tested 30 or 60 min later in the hot plate test.

2.4.5. Interaction of $[\text{Phe}^1\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)- NH_2 with morphine or dynorphin A_{1-17}

A combination of sub-effective doses of morphine (1000 ng/g) or dynorphin A_{1-17} (1 ng/g) at $t=0$ plus $[\text{Phe}^1\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)- NH_2 (100 ng/g) injected 15 min later was administered to snails that were tested at $t=60$ min, time at which all compounds exerted their maximum efficacy.

2.5. Data and statistical analyses

Values are expressed as mean \pm the standard error of the mean of 10 determinations. The area under the curve for each time course was calculated by the trapezoidal rule (Gibaldi, 1991). Complete dose–response curves were fitted with the Win-nonlin program (Pharsight, Co. Version 2.1) to calculate ED_{50} values and their 95% confidence limits. Differences between the distinct treatment groups were analysed with a Kruskal–Wallis ANOVA followed by the Tukey test. Significance was set for $P < 0.05$. The statistical program used was Sigma Stat 3.1. Graphs were plotted using Sigma Plot version 10 software (Jandel Scientific).

3. Results

3.1. Time and dose–response curves

The ensuing data represent the response latencies as a function of time and dose (Fig. 2). Response latency reductions reflect pronociceptive effects, while increased response latencies reflect antinociceptive actions.

The time and dose–response curves for N/OFQ (1–30 ng/g) and naloxone (30–3000 ng/g) in the hot plate test are shown in Fig. 2, panels A and B, respectively. Both the NOP receptor agonist and the competitive opioid receptor antagonist produced a dose-related shortening in the response latency to the thermonociceptive stimulus. For the higher doses of N/

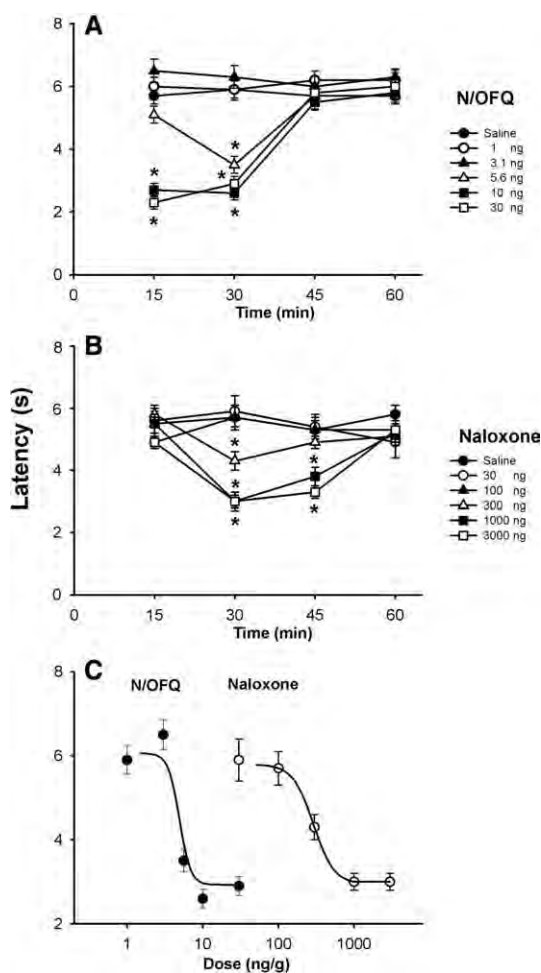


Fig. 2. Time course (panels A and B) and dose–response (panel C) curves showing the effect of nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) and naloxone on the latency to the withdrawal thermonociceptive response of *Helix aspersa* in the hot plate test. Increasing doses of each compound (1–30 ng for N/OFQ and 30–3000 ng for naloxone) were administered to independent groups of snails at time=0 and animals were tested at 15, 30, 45 or 60 min post-injection. Each point represents mean latencies \pm S.E.M. of 10 snails for each dose at each time point. A significant shortening in the response latency is evident with N/OFQ (panel A) at 15 and 30 min post-injection, and with naloxone (panel B) at 30 and 45 min (Kruskal–Wallis ANOVA followed by Tukey test, $*P < 0.05$). A dose–response curve (panel C) for each drug was made considering peak effects at minute 30.

Table 1

Parameters of the dose–response curves

	E_{max} (s)	ED ₅₀ (ng/g)	[95% Confidence intervals]
N/OFQ	6.06 \pm 0.4	4.9	[4.78–5.02]
Naloxone	5.8 \pm 0.1	290.6	[287.9–293.3]
Phe ¹ Ψ	29.4 \pm 0.9	177.2	[135.2–219.2]
Dynorphin 1–17	30 \pm 0.5	3.4	[2.91–3.89]
Morphine	30.2 \pm 0.4	5547.9	[5284–5812]

Curves were adjusted using the Win-nonlin program to calculate ED₅₀ values.

OFQ (10 and 30 ng/g), peak effects (response latency reductions of 47% and 50.8%, respectively) were observed between 15 and 30 min after injection which faded away 45 min later. As to naloxone, its maximal pronociceptive effect occurred at 30 min post-injection and disappeared 30 min later. The analysis of adjusted dose–response curves for both compounds (Fig. 2, panel C) revealed that they had a similar efficacy, but N/OFQ was approximately 30 times more potent than naloxone (Table 1).

Fig. 3 shows the time course of the antinociception produced by different concentrations of [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂, (panel A), dynorphin A_{1–17} (panel B) and morphine (panel C). Regardless of their different site of action, the three compounds produced similar antinociception. Morphine and dynorphin A_{1–17} achieved their peak effects 60 min post-injection and response latencies returned to basal values 30 min later. Although [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ had a similar efficacy as morphine and dynorphin A_{1–17}, it reached its peak more rapidly, 45 min after injection, and this effect lasted longer than those observed with the reference opioid receptor agonist compounds.

To further analyse differences in efficacy, the areas under the curve corresponding to the complete time course of the highest doses of each drug were determined. The area under the curve values of the highest concentration for each compound used; i.e., 560 ng/g [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂, 5.6 ng/g dynorphin A_{1–17}, and 10,000 ng/g morphine were: 1599 \pm 46.4, 1215.8 \pm 16.3 and 1107.8 \pm 14.9, respectively. This analysis revealed that [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ was significantly more effective than the other two antinociceptive compounds ($P < 0.05$; Tukey test).

Differences in potency were determined based on the dose–response curves of each drug and their adjusted parameters (Fig. 3, panel D and Table 1). [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ turned out to be a compound of intermediate potency. Based on their estimated ED₅₀ values (Table 1), [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ is approximately 50 times less potent than dynorphin A_{1–17}, but 30 times more potent than morphine.

3.2. Interaction experiments

These experiments were done to determine the interaction of drugs acting at the NOP receptor with compounds acting at the classic opioid receptor system.

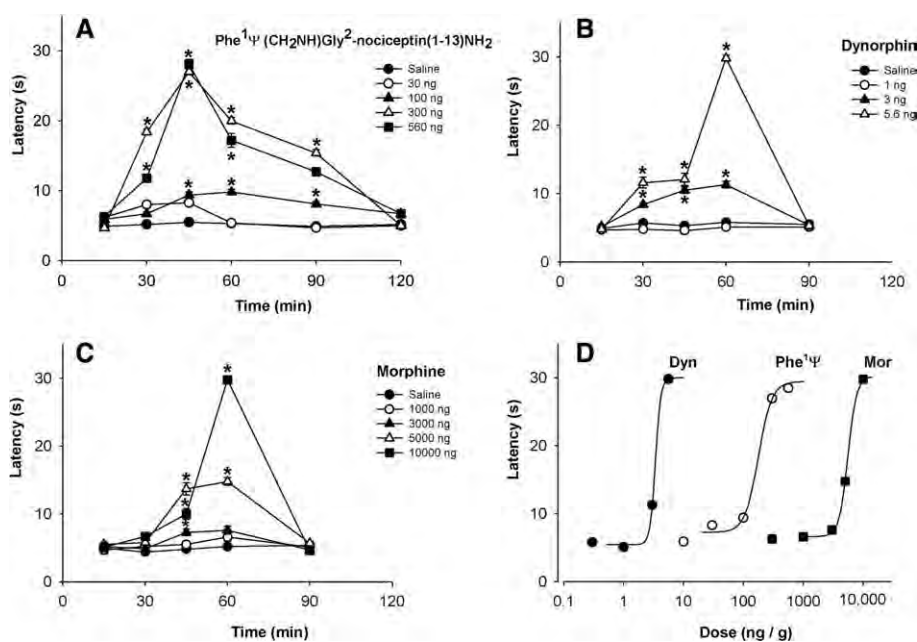


Fig. 3. Time course showing the effect of [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂, (Phe¹Ψ; panel A), dynorphin A_{1–17} (panel B), and morphine (panel C) on the latency to the withdrawal thermnociceptive response in *Helix aspersa*. Increasing doses of the three compounds were administered to independent groups of snails and tested at different post-injection times (15–120 min for Phe¹Ψ and 15–90 min for dynorphin A_{1–17} and morphine). Each point represents the mean ± S.E.M. of the latencies of 10 snails (Kruskal–Wallis ANOVA followed by Tukey test, **P* < 0.05). Dose–response curves (panel D) for dynorphin A_{1–17} (Dyn), [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ (Phe¹Ψ) and morphine (Mor) were made considering the time at which peak effects were achieved (60 min for morphine and dynorphin A_{1–17}, and 45 min for Phe¹Ψ).

3.2.1. Interaction of N/OFQ with compounds that produce antinociception

In this experiment, a maximally effective dose of N/OFQ (10 ng/g) was combined with maximally effective doses of [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ (560 ng/g), morphine (10,000 ng/g) or dynorphin A_{1–17} (5.6 ng/g) and the results were compared with those observed in snails treated with each individual drug. Saline-treated snails served as control. These results are shown in Fig. 4, panel A. As previously mentioned, N/OFQ produced a significant pronociceptive effect manifested as a decrease in response latency, while [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ significantly increased the latency to head retraction. The combined administration of N/OFQ and [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ showed no significant changes in response latency with respect to the control group, indicating that both the pronociceptive effect of N/OFQ and the antinociceptive effect of [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ disappeared when the two compounds were given together. Co-administration of N/OFQ with either morphine or dynorphin A_{1–17} resulted in mutual antagonism because neither pronociception nor antinociception was observed.

3.2.2. Interaction of N/OFQ with naloxone

Snails treated with an individual sub-effective dose of N/OFQ (1 ng/g) or naloxone (100 ng/g) did not show difference in response latencies with respect to the control group, as expected. However, when the two compounds were combined at these same doses, a significant decrease in response latency was observed (Fig. 4, panel B).

3.2.3. Interaction of morphine with naloxone

The combined treatment of effective doses of morphine (10,000 ng/g) and naloxone (1000 ng/g) resulted in blockade of both naloxone-induced pronociception and morphine-induced antinociception at the two tested times because no difference was observed between the groups treated with both compounds and the control group (Fig. 4, panel C).

3.2.4. Interaction of [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ with morphine or dynorphin A_{1–17}

The combined administration of low doses of [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ (100 ng/g) and morphine (1000 ng/g) or dynorphin A_{1–17} (1 ng/g) produced a significant increase in the response latency as compared with [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂, morphine or dynorphin A_{1–17} alone, as well as with respect to the control group (Fig. 4, panel D).

4. Discussion

Our results show that administration of N/OFQ into the hemocoel of *H. aspersa* produced a dose-dependent pronociceptive effect, evidenced by a decrease of around 50% in the response latency to the thermnociceptive stimulus. The pseudopeptide [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂, a compound acting as an NOP receptor antagonist, produced a dose-related antinociceptive effect, i.e., the opposite of N/OFQ.

Morphine and dynorphin A_{1–17} produced a significant dose-related antinociceptive effect in this snail (increased response latency), while the opioid receptor antagonist naloxone exerted a

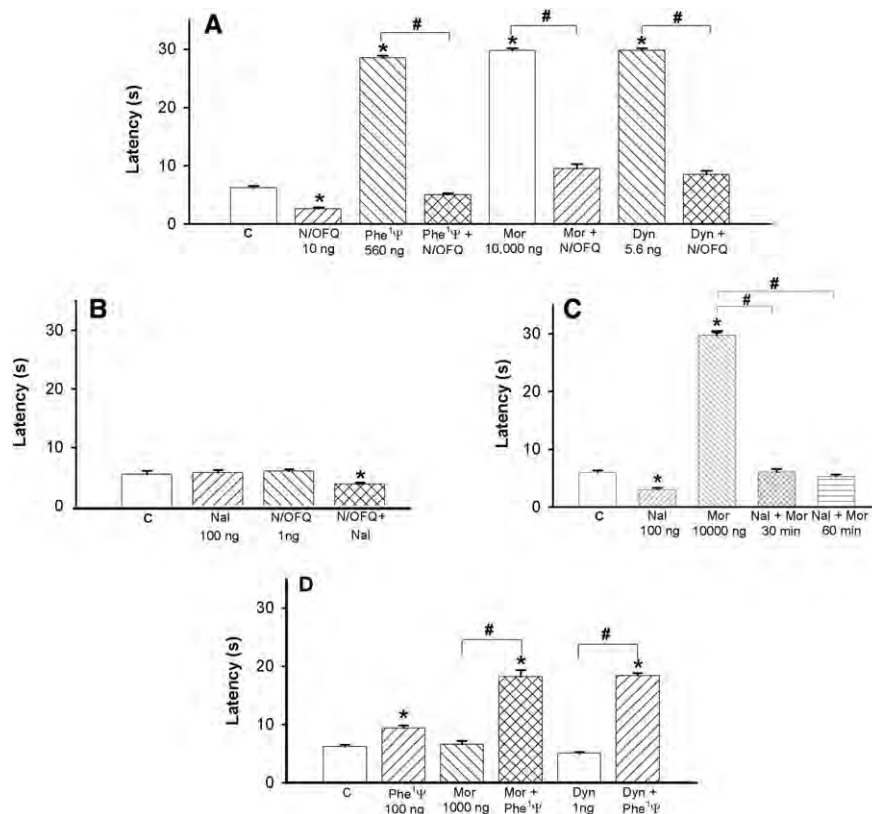


Fig. 4. Panel A: Latencies to withdrawal behaviour of control saline-treated snails and animals treated with $[\text{Phe}^1\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)- NH_2 ($\text{Phe}^1\Psi$, 560 ng/g, $t=45$ min), morphine (Mor, 10,000 ng/g, $t=60$ min) or dynorphin A_{1-17} (Dyn, 5.6 ng/g, $t=60$ min) alone or in combination with N/OFQ (10 ng/g, $t=30$ min). For the combined administrations, injection time was selected for each compound according to their individual maximum effect. For the $\text{Phe}^1\Psi$ +N/OFQ combination, $\text{Phe}^1\Psi$ was injected at $t=0$, N/OFQ at $t=15$ min and snails were tested at $t=45$ min. For the Mor+N/OFQ and Dyn+N/OFQ combinations, animals received Mor or Dyn at $t=0$, N/OFQ at $t=30$ min and were tested at $t=60$ min. Panel B: Withdrawal behaviour response latencies of animals treated with sub-effective doses of naloxone (Nal, 100 ng/g) or N/OFQ (1 ng/g) alone or in combination. Naloxone and N/OFQ were administered simultaneously at $t=0$ and snails tested at $t=30$ min. Panel C: Response latencies of snails injected with naloxone (Nal, 1000 ng/g) or morphine (Mor, 10,000 ng/g) alone or in combination. The peak effect of naloxone was observed at $t=30$ min, while that of morphine was achieved at $t=60$ min. To control for this temporal difference, the effects of the combined treatment of these compounds were tested in two different groups one tested at $t=30$ min and another at $t=60$ min. Panel D: Latencies to withdrawal behaviour of snails injected with a sub-effective dose of morphine (Mor, 1000 ng/g) or dynorphin A_{1-17} (Dyn, 1 ng/g) alone or in combination with a low dose of $[\text{Phe}^1\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)- NH_2 ($\text{Phe}^1\Psi$, 100 ng/g). For both combinations Mor+ $\text{Phe}^1\Psi$ or Dyn+ $\text{Phe}^1\Psi$, Mor or Dyn were administered at $t=0$, $\text{Phe}^1\Psi$ at $t=5$ min and the snails were tested at $t=60$ min. Kruskal–Wallis ANOVA followed by Tukey test, *, # $P<0.05$. Asterisks indicate comparisons versus the control group, # points to comparisons versus the *per se* effect of the compounds at the doses used in the combination.

pronociceptive effect (decreased response latency) that also depended on the dose administered.

The pronociceptive effect of N/OFQ found in the present work is in line with the results obtained in the snail *Cepaea nemoralis* (Kavaliers and Perrot-Sinal, 1996) and analogous to the one reported in rodents after the i.c.v. administration of 10 μg N/OFQ (Reinscheid et al., 1995; Meunier et al., 1995). There is however, a report demonstrating in tail-flick trials that the actions of i.c.v. administered N/OFQ (10 μg) to rats are biphasic; i.e., they consist of an early pronociceptive effect observed at 15 min post-injection and a late antinociceptive effect seen 60 min after injection (Rossi et al., 1996). In our study, only pronociceptive effects of N/OFQ were detected along a 90 min recording period after its administration, even at the highest dose tested (30 ng/g). It remains to be determined if higher doses have biphasic effects in the *H. aspersa* model.

A reduction in locomotor activity has been reported in rats after the i.c.v. injection of N/OFQ at doses ranging between 0.1 and 10 nM (Devine et al., 1996), whereas in mice i.c.v. injection of a 10 ng dose stimulates locomotor activity (Florin et al., 1996). Though our study was not designed to quantify locomotor activity, no apparent motor effect was detected with the administered doses (1–30 ng).

The antinociceptive effect produced by the pseudopeptide $[\text{Phe}^1\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)- NH_2 has not been reported before in molluscs. There are several reports in rodents showing that i.c.v. injection of $[\text{Phe}^1\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin (1–13)- NH_2 produces pronociceptive responses in the tail-flick test, while its i.t. administration produces antinociceptive effects in the same assay (Calo et al., 1998; Wang et al., 1999; Candeletti et al., 2000). In agreement with the antinociceptive actions of $[\text{Phe}^1\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)- NH_2 reported here, Carpenter and Dickenson (1998) found that this pseudopeptide

inhibits the noxious evoked activity (C fibres), but leaves unmodified the evoked response of beta fibres in the rat spinal cord.

[Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ has been classified as a competitive antagonist of the NOP receptor in the guinea pig ileum and rat vas deferens assays (Guerrini et al., 1998). However, it has also been proposed that [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ acts as a partial antagonist (Okawa et al., 1999) and even as an NOP receptor agonist (Butour et al., 1998; Bertorelli et al., 1999; Calo et al., 1998; Grisel et al., 1998; Yakimova and Pierau, 1999; Wang et al., 1999). It has been proposed that a relevant factor for the type of effect produced by [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ is the number of NOP receptors that are expressed in the experimental preparation. Thus, low levels of receptors could make [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ behave as an antagonist, while higher concentrations could make this peptide behave as a partial agonist (Olianas et al., 1999; Toll et al., 1999). An alternative hypothesis suggests that these varying effects of [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ or N/OFQ depend upon certain NOP receptor heterogeneity (Mathis et al., 1997). The diversity of effects observed with both compounds suggests that the functional activity of NOP receptor ligands strongly depends on the type of preparation or assay used in their pharmacological characterisation (Calo et al., 1998, 2000; Meis and Pape, 1998; Xu et al., 1998; Okawa et al., 1999; Yakimova and Pierau, 1999; Candeletti et al., 2000).

In the present work, [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ showed an effect opposed to N/OFQ and was able to block the pronociceptive effect of N/OFQ when they were combined. These results suggest that [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ acts as a NOP receptor antagonist for a wide dose range in *H. aspersa*.

As to the classical opioid receptor systems, present results show that morphine and dynorphin A_{1–17} administration to *H. aspersa* produces a significant increase in response latency, while naloxone diminished it. Co-administration of naloxone and morphine resulted in the blockade of the antinociceptive effect of the opioid receptor agonist. Together, these data show that in *H. aspersa* the nociceptive actions of classical opioid compounds described in higher species, are adequately reflected. These results agree with previous reports in the literature in which the same compounds were tested in another snail: *C. nemoralis* and similar responses were described (Kavaliers and Hirst, 1983; Kavaliers and Perrot-Sinal, 1996; Dyakonova et al., 1995).

Comparison of the pronociceptive actions of N/OFQ and naloxone revealed that both compounds produce a similar effect, but N/OFQ reaches its peak effect earlier and is approximately 30 times more potent than naloxone. As to the antinociceptive effect of [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂, dynorphin A_{1–17} and morphine, analysis of their adjusted dose–response curves demonstrates that they have a similar efficacy, however, [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ reaches its peak more rapidly and its effect lasts longer than that of dynorphin A_{1–17} or morphine. In relation to their potency, [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ is approximately 50 times less potent than dynorphin A_{1–17}, but 30

times more potent than morphine. It is important to mention, that the relative potency of antinociceptive compounds has not been determined in other studies involving molluscs.

It has been demonstrated that neither [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂, nor N/OFQ binds to classic opioid receptors. The available evidence suggests that both peptides bind only with high affinity to the NOP receptor (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995; Guerrini et al., 1998; Nicholson et al., 1998; Reinscheid et al., 1998; Xu et al., 1998). Morphine is a non-selective opioid receptor agonist, naloxone a non-selective opioid receptor antagonist and dynorphin A_{1–17} a κ opioid receptor agonist. Based on the different receptors through which these compounds exert their effects, N/OFQ and [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ have been proposed to act through a parallel so-called anti-opioid system (Mogil et al., 1996a; Grisel et al., 1998; Jhamandas et al., 1998; King et al., 1998; Kotlinska et al., 2000; Li et al., 2004; Chen et al., 2007; Scoto et al., 2007). Clearly in *H. aspersa* both classic opioid and anti-opioid systems play a critical role in nociception modulation.

The experiments designed to gain some insight into the relationship between these two systems, provided interesting results. The interaction of N/OFQ with morphine and dynorphin A_{1–17}, resulted in a marked reduction of both opioid agonist-induced antinociceptive effects. On the other hand, when combining low doses of the pseudopeptide [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ with morphine or dynorphin A_{1–17}, they produced a potent antinociceptive effect that was, at least, similar to the arithmetic sum of the individual effects. The fact that two compounds that act at different receptor types produce additive or supra-additive effects opens the possibility for the use of low doses of each drug to get effective antinociception, while reducing the adverse effects produced by high doses of the individual compounds (Hernandez-Delgado and Cruz, 2004).

[Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ enhanced the effects of morphine and dynorphin A_{1–17}, while N/OFQ blocked them. However, neither [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂ nor N/OFQ act through classical opioid receptors. Based on this, our results could be explained by physiological antagonism and agonism, respectively. N/OFQ has been proposed to act as an endogenous anti-opioid peptide at a supraspinal level in rats (Mogil et al., 1996a; Grisel et al., 1998; Jhamandas et al., 1998; King et al., 1998; Chen et al., 2007; Scoto et al., 2007) and there are several reports showing that N/OFQ blocks morphine-induced analgesia in rodents (Morgan et al., 1997; Zhu et al., 1997; Li et al., 2004; Chen et al., 2001, 2007).

The data obtained in the present series of experiments do not allow us to establish if other neurotransmitter system(s) is (are) involved in the effects of N/OFQ and [Phe¹Ψ(CH₂NH)Gly²]-nociceptin(1–13)-NH₂. Kavaliers et al. (1997) reported that a specific NMDA receptor antagonist, NPC 12626, reduces the pronociceptive effects of N/OFQ in the snail *C. nemoralis* in a dose-dependent manner. Thus, NMDA receptors could contribute to the “anti-opioid” effects of N/OFQ in *H. aspersa*, but this remains to be determined.

When we analysed the effects of the combined administration of sub-effective doses of naloxone and N/OFQ, the two compounds that produced pronociceptive effects, we found a significant reduction in the response latency to the thermonociceptive stimulus. These results coincide with those reported by [Lutfy and Maidment \(2000\)](#) in rats, in which the combination of N/OFQ and naloxone induced a higher pronociceptive response than the one produced by each individual compound. Again, an interaction through parallel systems appears to be involved in this synergism.

The present work allowed establishing that the N/OFQ/NOP receptor system plays a role in the regulation of thermonociception in *H. aspersa* and permitted the comparison of the efficacy and potency of classical opioid compounds and those involved in NOP receptor-mediated nociception. The interaction experiments suggest that these two opioid classes play an important role in the regulation of the nociceptive state of the snail through parallel systems. These results introduce *H. aspersa* as an interesting model to follow the course of opioid and N/OFQ systems' evolution. Given the fact that the nervous system distribution of N/OFQ as well as the electrophysiological neural responses to this peptide have been described earlier ([León-Olea et al., 2001](#)) and that in the present work the effects of N/OFQ on thermonociception were analysed, the *H. aspersa* model appears as a valuable experimental preparation to continue the study of these opioid receptor systems.

Acknowledgements

The authors wish to thank Mr. F. Camacho-García for technical assistance and M. Sánchez-Álvarez for the English version of this text. This work was partially supported by grant 21151-N from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); Fondo de Apoyo para la Investigación from INPRF and by Fundación Miguel Alemán A.C. to MLO.

References

- Bertorelli, R., Corradini, L., Rafiq, K., Tupper, J., Calò, G., Ongini, E., 1999. Nociceptin and the ORL-1 ligand $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)-NH₂ exert anti-opioid effects in the Freund's adjuvant-induced arthritic rat model of chronic pain. *Br. J. Pharmacol.* 128, 1252–1258.
- Bunzow, J.R., Saez, C., Mortrud, M., Bouvier, C., Williams, J., Low, M., Grandy, D., 1994. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a δ or κ opioid receptor type. *FEBS Lett.* 347, 284–288.
- Butour, J.-L., Moisan, C.H., Mollereau, C., Meunier, J.-C., 1998. $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)-NH₂ is an agonist of the nociceptin (ORL1) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 349, R5–R6.
- Calo, G., Guerrini, R., Bigoni, R., Rizzi, A., Bianchi, C., Regoli, D., Salvadori, S., 1998. Structure-activity study of the nociceptin (1–13)NH₂ N-terminal tetrapeptide and discovery of a nociceptin receptor antagonist. *J. Med. Chem.* 41, 3360–3366.
- Calo, G., Guerrini, R., Rizzi, A., Salvadori, S., Regoli, D., 2000. Pharmacology of nociceptin and its receptors: a novel therapeutic target. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1261–1283.
- Candeletti, S., Guerrini, R., Calo, G., Romualdi, P., Ferri, S., 2000. Supraspinal and spinal effects of $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)-NH₂ on nociception in the rat. *Life Sci.* 66, 257–264.
- Carpenter, K.J., Dickenson, A.H., 1998. Evidence that $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)-NH₂, a peripheral ORL-1 receptor antagonist, acts as an agonist in the rat spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 125, 949–951.
- Chen, Y., Fan, Y., Liu, J., Mestek, A., Tian, M., Kozak, Ca., Yu, L., 1994. Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett.* 347, 279–283.
- Chen, X., McClatchy, D.B., Geller, E.B., Liu-Chen, L., Tallarida, R.J., Adler, M.W., 2001. Possible mechanism of hypothermia induced by intracerebroventricular injection of orphaninFQ/nociceptin. *Brain Res.* 904, 252–258.
- Chen, X., Geller, E.B., Adler, M.W., 2007. Nociceptin/orphanin FQ blocks the antinociception induced by μ , κ and δ opioid agonists on the cold water tail-flick test. *Eur. J. Pharmacol.* 557, 32–36.
- Chu, X., Xu, N., Li, P., Wang, J.Q., 1999. The nociceptin receptor-mediated inhibition of the rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 364, 49–53.
- Devine, D.P., Taylor, L., Reinscheid, R.K., Monsma Jr., F.J., Civelli, O., Akil, H., 1996. Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. *Neurochem. Res.* 21, 1387–1396.
- Di Giannuario, A., Pieretti, S., Catalani, A., Loizzo, A., 1999. Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis in rats. *Neurosci. Lett.* 272, 183–186.
- Dyakonova, V., Carlberg, M., Sakharov, D., Elofsson, R., 1995. Anatomical basis for interactions of enkephalin with other transmitters in the CNS of a snail. *J. Comp. Neurol.* 361, 38–47.
- Florin, S., Suaudeau, C., Meunier, J.C., Costentin, J., 1996. Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 317, 9–13.
- Fukuda, K., Kato, S., Mori, K., Nishi, M., Takeshima, H., Iwabe, N., Miyata, T., Houtani, T., Sugimoto, T., 1994. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett.* 343, 42–46.
- Gibaldi, M., 1991. Estimation of area under the curve, *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*, fourth ed. Lea and Febiger, Pennsylvania, pp. 377–378.
- Gintzler, A., Adapa, I., Toll, L., Medina, V., Wang, L., 1997. Modulation of enkephalin release by nociceptin (orphanin FQ). *Eur. J. Pharmacol.* 325, 29–34.
- Grisel, J.E., Farrier, D.E., Wilson, S.G., Mogil, J.S., 1998. $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ -nociceptin(1–13)-NH₂ acts as an agonist of the orphanin FQ/nociceptin receptor in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 357, R1–R3.
- Guerrini, R., Calo, G., Rizzi, A., Bigoni, R., Bianchi, C., Salvadori, S., Regoli, D., 1998. A new selective antagonist of the nociceptin receptor. *Br. J. Pharmacol.* 123, 163–165.
- Hernández-Delgado, G.P., Cruz, S.L., 2004. Dipyrone potentiates morphine-induced antinociception in dipyrone-treated and morphine-tolerant rats. *Eur. J. Pharmacol.* 502, 67–73.
- Jhamandas, K.H., Sutak, M., Henderson, G., 1998. Antinociceptive and morphine modulatory actions of spinal orphanin FQ. *Can. J. Physiol. Pharm.* 76, 314–324.
- Kavaliers, M., 1988. Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull.* 21, 923–932.
- Kavaliers, M., Hirst, M., 1983. Tolerance to morphine-induced thermal response in the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. *Neuropharmacology* 22, 1321–1326.
- Kavaliers, M., Perrot-Sinal, T.S., 1996. Pronociceptive effects of the neuropeptide, nociceptin, in the land snail, *Cepaea nemoralis*. *Peptides* 17, 763–768.
- Kavaliers, M., Cholieris, E., Saucier, D.M., 1997. The NMDA receptor antagonist, NPC 12626, reduces the pronociceptive effects of orphanin FQ and kappa opiate antinociception in the land snail, *Cepaea nemoralis*. *Peptides* 18, 943–947.
- King, M., Chang, A., Pasternak, G.W., 1998. Functional blockade of opioid analgesia by orphanin FQ/nociceptin. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1537–1540.
- Kotlinska, J., Suder, P., Legowska, A., Rolka, K., Silberring, J., 2000. Orphanin FQ/nociceptin inhibits morphine withdrawal. *Life Sci.* 66, PL119–PL123.
- Lachowitz, J.E., Shen, Y., Monsma, F.J., Sibley, D.R., 1995. Molecular cloning of a novel G protein-coupled related to the opiate receptor family. *J. Neurochem.* 64, 34–40.
- León-Olea, M., 2002. Evolución filogenética del dolor. *Elementos* 9, 19–24.
- León-Olea, M., Miller-Pérez, C., Cruz, R., Antón, B., Vega, R., Soto, E., 2001. Immunohistochemical localization and electrophysiological action of nociceptin/orphanin-FQ in the snail (*Helix aspersa*) neurons. *Neurosci. Lett.* 316, 141–144.
- Li, N., Wei, S.Y., Yu, L.C., Moriyama, K., Mitchell, J., Palmer, P.P., 2004. Role of nociceptin in the modulation of nociception in the arcuate nucleus of rats. *Brain Res.* 1025, 67–74.

- Lutfy, K., Maidment, N.T., 2000. Blockade of mu-opioid receptors reveals the hyperalgesic effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat hot plate test. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1684–1688.
- Mathis, J.P., Ryan-Moro, J., Chang, A., Hom, J.S., Scheinberg, D.A., Pasternak, G.W., 1997. Biochemical evidence for orphanin FQ/nociceptin receptor heterogeneity in mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 462–465.
- Meis, S., Pape, H.C., 1998. Postsynaptic mechanisms underlying responsiveness of amygdaloid neurons to nociceptin/orphanin FQ. *J. Neurosci.* 18, 8133–8144.
- Meunier, J.C., 1997. Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 340, 1–15.
- Meunier, J.-C., Mollereau, C., Toll, L., Saudeau, C., Miosand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., Monserrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M., Costentin, J., 1995. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377, 532–535.
- Mogil, J.S., Grisel, J.E., Reinscheid, R.K., Civelli, O., Belknap, J.K., Grandy, D.K., 1996a. Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience* 75, 333–337.
- Mogil, J.S., Grisel, J.E., Zhangs, G., Belknap, J.K., Grandy, D.K., 1996b. Functional antagonism of mu-, delta- and kappa-opioid antinociception by orphanin FQ. *Neurosci. Lett.* 214, 131–134.
- Morgan, M.M., Grisel, J.E., Robbins, C.S., Grandy, D.K., 1997. Antinociception mediated by the periaqueductal gray is attenuated by orphanin FQ. *NeuroReport* 8, 3431–3434.
- Nicholson, J.R., Paterson, S.J., Menzies, J.R., Corbett, A.D., McKnight, A.T., 1998. Pharmacological studies on the “orphan” opioid receptor in central and peripheral sites. *Can. J. Physiol. Pharm.* 76, 304–313.
- Okawa, H., Nicol, B., Bigoni, R., Hirst, R.A., Calo, G., Guerrini, R., Rowbotham, D.J., Smart, D., McKnight, A.T., Lambert, D.G., 1999. Comparison of the effects of $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ nociceptin-(1–13)-NH₂ in rat brain, rat vas deferens and CHO cells expressing recombinant human nociceptin receptors. *Br. J. Pharmacol.* 127, 123–130.
- Olianas, M.C., Maullu, C., Ingiani, A., Onali, P., 1999. $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ nociceptin-(1–13)-NH₂ acts as a partial agonist at ORL1 receptor endogenously expressed in mouse N1E-115 neuroblastoma cells. *NeuroReport* 10, 1127–1131.
- Pan, Z., Hirakawa, N., Fields, H.L., 2000. A cellular mechanism for the bidirectional pain-modulating actions of orphanin FQ/nociceptin. *Neuron* 26, 515–522.
- Pellicer, F., Asai, M., León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., 1993. In vitro release of IR-Met and IR-Leu-enkephalins in whole periesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 104C, 323–325.
- Reinscheid, R.K., Nothacker, H.P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Buzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma Jr., F.J., Civelli, O., 1995. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor. *Science* 270, 792–794.
- Reinscheid, R.K., Higelin, J., Henningsen, R.A., Monsma Jr., F.J., Civelli, O., 1998. Structures that delineate orphanin FQ and dynorphin A pharmacological selectivities. *J. Biol. Chem.* 273, 1490–1495.
- Rossi, G.C., Leventhal, L., Pasternak, G.W., 1996. Naloxone sensitive orphanin FQ-induced analgesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 311, R7–R8.
- Rossi, G.C., Leventhal, L., Bolan, E., Pasternak, G.W., 1997. Pharmacological characterization of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 858–865.
- Rossi, G.C., Perlmutter, M., Leventhal, L., Talatti, A., Pasternak, G.W., 1998. Orphanin FQ/nociceptin analgesia in the rat. *Brain Res.* 792, 327–330.
- Scoto, G.M., Arico, G., Ronsisvalle, S., Parenti, C., 2007. Blockade of the nociceptin/orphanin FQ/NOP receptor system in the rat ventrolateral periaqueductal gray potentiates DAMGO analgesia. *Peptides* 28, 1441–1446.
- Toll, L., Burnside, J., Berzetei-Gurske, I., 1999. Agonist Activity of ORL1 Antagonists is Dependent upon Receptor Number, Abstract A89. INRC Conference, Garmisch-Partenkirchen.
- Vanderah, T.W., Raffa, R.B., Lashbrook, J., Burrit, A., Hruby, V., Porreca, F., 1998. Orphanin-FQ/nociceptin: lack of antinociceptive, hyperalgesic or allodynic effects in acute thermal or mechanical test following intracerebroventricular or intrathecal administration to mice or rats. *Eur. J. Pain* 2, 267–278.
- Wang, J.B., Johnson, P.S., Persico, A.M., Hawkins, A.I., Griffin, C.A., Uhl, G.R., 1994. Human μ opiate receptor cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett.* 338, 217–222.
- Wang, Y.Q., Zhu, C.B., Cao, X.D., Wu, G.C., 1999. Supraspinal hyperalgesia and spinal analgesia by $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ nociceptin-(1–13)-NH₂ in rat. *Eur. J. Pharmacol.* 376, R1–R3.
- Wick, M.J., Minnerath, S.R., Lin, X., Elde, R., Law, P.Y., Loh, H.H., 1994. Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Mol. Brain Res.* 27, 37–44.
- Xu, X.J., Hao, J.X., Wiesenfeld-Hallin, Z., 1996. Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *NeuroReport* 7, 2092–2094.
- Xu, I.S., Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X.J., 1998. $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ nociceptin-(1–13)-NH₂, a proposed antagonist of the nociceptin receptor, is a potent and stable agonist in the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 249, 127–130.
- Yakimova, K.S., Pierau, Fr.K., 1999. Effect of nociceptin and $[\text{Phe}^1\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}^2]$ nociceptin-(1–13)-NH₂ on tonic activity of rat hypothalamic neurons. *Neurosci. Lett.* 247, 87–90.
- Zakharov, I.S., Ierusalimsky, V.N., Balaban, P.M., 1995. Pedal serotonergic neurons modulate the synaptic input of withdrawal interneurons of *Helix*. *Invertebr. Neurosci.* 1, 41–52.
- Zhu, C.B., Cao, X.D., Xu, S.F., Wu, G.C., 1997. Orphanin FQ potentiates formalin-induced pain behavior and antagonizes morphine analgesia in rats. *Neurosci. Lett.* 235, 37–40.

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 de opioides δ , μ and κ fue seguida por identificación y secuenciación de otro miembro de la familia de opioides: el receptor como-1 (ORL-1). Aunque comparten similitudes con receptores μ , δ and κ , endógenos opioides como β -endorfina, dinorfina A y encefalinas no tienen gran afinidad por este receptor. Después de la descubierta de ORL-1, su péptido endógeno fue aislado. Este péptido presenta una afinidad nanomolar con su receptor. Dos grupos de investigación reportaron este péptido: Meunier et al. (1995) lo llamó nociceptina, y Reinscheid et al. (1995) lo llamó orfanina FQ. ORL-1 and nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) tienen una amplia distribución anatómica en el sistema nervioso, principalmente en el núcleo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, región septal, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, puente, bulbo, pedúnculos cerebrales, médula espinal y retina. Esto evidencia su participación en diversas funciones cerebrales. La administración de N/OFQ puede producir hiperalgesia, alodinia, efectos antiopioideos 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 pre-nociceptina (PPNOC), el cual contiene una sola copia de la secuencia

que respalda la idea de que este nuevo sistema opioide tiene un origen filogenético temprano y una continuidad funcional durante el curso de la evolución.

En este artículo se revisa la literatura concerniente a este receptor/péptido opioide ORL-1 and su péptido endógeno 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 antiopioideos 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 pre-nociceptina (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.

de aminoácidos de la N/OFQ. El gen de la PPNOC está conservado en cinco especies animales estudiadas (rata, ratón, porcino, bovino y humano) y se expresa predominantemente en hipotálamo, mesencéfalo, núcleos del lemnisco lateral, oliva superior, núcleo trigeminal espinal y médula espinal. Debido al reciente descubrimiento de este péptido y su receptor, además de su amplia distribución en el sistema nervioso, resulta obvio que su participación en la fisiología y sus probables implicaciones farmacológicas todavía no están completas. La presencia de la N/OFQ en especies de los primeros niveles de la escala filogenética como son los moluscos *Helix aspersa*, *H. pomatia* y *Cepaea nemoralis*, donde se demostró también que la administración de N/OFQ tiene un efecto pronociceptivo similar a la hiperalgesia de los mamíferos, sugieren que este nuevo sistema opioide tiene un origen filogenético temprano y una continuidad funcional durante el curso de la evolución.

En este artículo se hace una revisión de la literatura acerca de este nuevo receptor: el ORL-1 y su péptido endógeno, la nociceptina/orfanina FQ.

Palabras clave: Péptidos opioides, receptores opioides, nociceptina, orfanina FQ, ORL-1.

INTRODUCCIÓN

Los avances en las técnicas de la biología molecular y, en especial, la clonación y la caracterización de los receptores opioides δ , μ y κ (24, 26, 47, 48, 65, 103) permitieron el descubrimiento y la caracterización de un nuevo receptor: el ORL-1 (por sus siglas en inglés, *opioid receptor like-1*) (62). 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 o antagonistas (8, 68, 93).

Este receptor se describió por varios autores en diferentes especies animales con distintos nombres (Cuadro 1).

CUADRO 1
Diferentes nombres del receptor de la nociceptina/orfanina FQ

Receptor	Animal	Referencia
LC132	rata	Bunzow y cols., 1994
ROR-C	rata	Fukuda y cols., 1994
Oprl	rata	Chen y cols., 1994
C3	rata	Lachowicz y cols., 1994
XOR1	rata	Wang y cols., 1994
MOR-C	ratón	Nishi y cols., 1994
Hyp 8-1	humano	Wick y cols., 1994
ORL-1	humana	Mollereau y cols., 1994 Marchese y cols., 1994 Keith y cols., 1994
	cerdo	Osinsky y cols., 1999

El ORL-1, al igual que los receptores opioides, son proteína membranal acoplada a proteínas G de tipo inhibitorio (Gi), que inhibe la adenilato ciclasa y la entrada de calcio a la célula, y que aumenta la conductancia de la membrana al potasio (4, 81, 105, 112). El análisis comparativo de la estructura de los receptores opioides μ , δ , κ con el ORL-1 muestra que éstos receptores están formados por siete dominios peptídicos transmembranales altamente hidrofóbicos, un extremo extracelular amino terminal y un extremo citoplasmático carboxilo terminal, ambos hidrofílicos (24, 103, 99).

La homología de los dominios trans-membranales entre los receptores μ , δ , κ está entre 60%-67% (1, 23, 99), mientras que comparados con el ORL-1 es de 63-65% (34, 61). 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 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 parecen confirmar estas hipótesis de acoplamiento funcional intracelular del receptor ORL-1 (13, 30, 33, 72). El análisis de la estructura del receptor ORL-1 muestra que se encuentra altamente conservado en la rata, el ratón y el humano (v.g., 95% de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos cuando se comparan las secuencias de la proteínas receptoras del humano y la rata).

El gen del ORL-1 se localiza en la región distal del cromosoma 2 del ratón (10,78) y en el humano en la región q 13.2-13.3 del cromosoma 20 (47, 69). La secuencia que codifica al ORL-1 en términos de la organización de intrones-exones es casi idéntica a los receptores μ , δ , κ . Lo anterior sugiere que los cuatro genes que dan origen a estos receptores provienen de un ancestro común y por tanto pertenecen a una misma familia (62).

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 *substantia nigra*, 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 (107).

Estos estudios se llevaron a cabo por medio de hibridación *in situ* del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) que lo codifica (6, 26, 69, 77), y por inmuno-histoquímica (2).

Esta distribución anatómica amplia sugiere su

participación en la modulación de diversas funciones cerebrales como: nocicepción, procesamiento motor, sensorial, cognoscitivo, neuroendocrino, así como en el aprendizaje y la memoria. El ORL-1 se localiza también en intestino, músculo esquelético, vasa deferente y bazo de rata (106) así como en linfocitos humanos (107); esto último implica un papel en las funciones inmunológicas.

La nociceptina/orfanina FQ: ligando endógeno del receptor ORL-1

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 K, se esperaba que el ligando endógeno del ORL-1 fuera parecido a la Dinorfina A. A partir de extractos crudos de cerebro de rata (62) y cerdo (91), dos grupos de investigación lograron identificar y aislar molecularmente un péptido endógeno que se une con alta afinidad al receptor ORL-1 ($K_d \sim 0.1$ nM), y es un potente agonista de este receptor ($ED_{50} \sim 1$ nM) (7). 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 (8, 68, 93).

Los efectos que produce la N/OFQ dependen de la dosis y de la vía de administración. Estos incluyen hiperalgesia, alodinia, efectos antiopioidérgicos y analgésicos, además de presentar otros efectos como modificación de las conductas locomotriz y exploratoria, la motivación, la ansiedad, memoria e ingesta de alimentos (58, 62, 93, 110) (Cuadro 2).

Precusores

Los péptidos opioides clásicos provienen de tres proteínas precursoras de alto peso molecular: la proopiomelanocortina (POMC) (76), la proencefalina A (12, 80) y la prodinorfina o proencefalina B (38). Estas proteínas precursoras contienen entre 209 y 267 aminoácidos y un peso molecular cercano a los 30 000 daltones. De ellas se derivan los péptidos opioides clásicos. A su vez, 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 (34, 62, 82, 86). El gen de la PPNOC se localiza en la región 8p21 del cromosoma 8 del humano (34, 70). Saito y colaboradores (1995) clonaron este mismo precursor aislado de células de neuroblastoma, el cual está codificado en el gen N23K. La PPNOC contiene varios sitios para el rompimiento enzimático, como los pares de aminoácidos básicos lisina y arginina, arginina y lisina, arginina y arginina (8, 19, 70, 83). En el procesamiento de la nociceptina intervienen las enzimas, aminopeptidasa N y la endopeptidasa 24.15 (71); la secuencia de la nociceptina está flanqueada por los pares de aminoácido básicos lisina y arginina, donde actúan estas enzimas (8, 71). En este precursor se encuentran sitios de rompimiento enzimático que originan diversos péptidos bioactivos que no se unen al ORL-1 y tienen efectos diferentes a la N/OFQ. Esta, 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 (14). 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 antagonico sobre la hiperalgesia y la alodinia inducidas por la N/OFQ. La nocistatina se conserva

CUADRO 2
Comparación entre la secuencia de aminoácidos de la nociceptina/orfanina FQ y 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 -Neoendorfina	-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-
Leu-encefalina	-Y-G-G-F-L-
Met-encefalino	-Y-G-G-F-M-

Los aminoácidos que comparte la N/OFQ con los péptidos opioides aparecen en negritas.

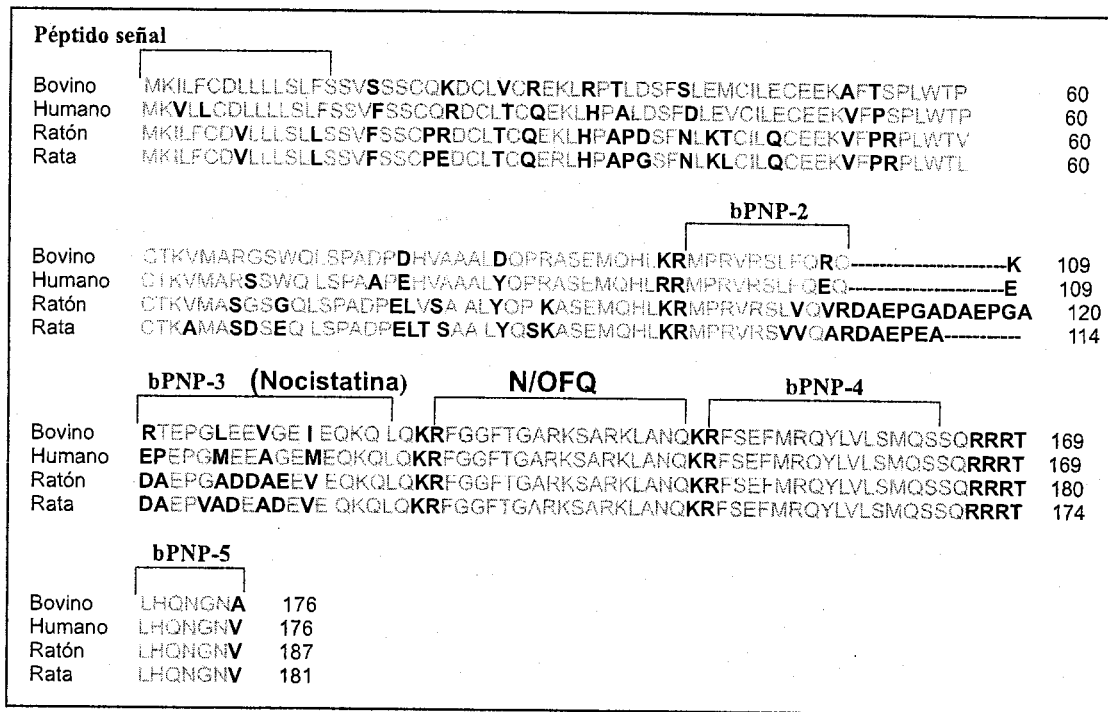


Figura 1. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la PPNOc de bovino, humano, ratón y rata. Los aminoácidos conservados en las cuatro especies se indican en gris; los aminoácidos de probable ruptura aparecen en negritas y el péptido señal y los péptidos que potencialmente se liberan se muestran con líneas en la parte superior (modificado de Okuda-Ashitaka y cols., 1998).

en humano, bovino y murino (14, 83). 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 muy similares a las de la preproencefalina y preprodinorfina, lo que sugiere que estos precursores pueden derivar de un ancestro común (17, 34, 70, 82). Por medio del análisis de Northern blot, se vio que el gen de la PPNOc se transcribe predominantemente en amígdala, tálamo, hipotálamo, núcleos subtalámicos y *substantia nigra* de rata y humano (82). (Fig. 1).

Distribución anatómica de la N/OFQ

La N/OFQ tiene una distribución anatómica amplia en el SNC de la rata (66, 77). En el cerebro, la inmunoreactividad (IR) a la N/OFQ (IR-N/OFQ) se localiza en sistema olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, región septal, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, puente, bulbo, pedúnculos cerebrales, complejo sensorial trigeminal, núcleos del rafe, *locus coeruleus*, cerebelo, médula espinal y retina (51, 52, 66, 92, 98).

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 (51, 52, 92, 98). En las astas dorsales de la médula espinal, la IR-N/OFQ persiste después de la rizotomía dorsal, lo que indica que el péptido se origina centralmente, más que en las neuronas aferentes primarias (92). Varias de estas regiones cerebrales y de la médula espinal contienen también péptidos opioides. Sin embargo, en estudios realizados con microscopía confocal en los que se utilizaron doble marcaje, se encontró que en general no existe colocación de los péptidos opioides y la N/OFQ, si bien hay algunas excepciones en ciertas fibras y terminales nerviosas (98). En un estudio reciente que compara la localización de la N/OFQ y del RNA mensajero de su precursor, la PPNOc, en el SNC de la rata, la IR a la N/OFQ y la expresión del ARNm de la PPNOc correlacionan en todas las áreas estudiadas (77). También se identificó en extractos de hipotálamo de mono mediante técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se detectaron múltiples picos de inmunoreactividad, y el pico más alto se coeluyó con el péptido sintético N/OFQ (88).

ALGUNOS ASPECTOS DE LA FISIOLÓGIA DE LA NOCICEPTINA

Los péptidos opioides participan en varios sistemas biológicos como la nocicepción, la neurosecreción y la regulación hormonal, e intervienen en el crecimiento y el desarrollo de los organismos. Su efecto a nivel celular es principalmente 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 que su distribución anatómica, la N/OFQ y el ORL-1, tienen una alta densidad en los núcleos asociados con los procesos nociceptivos (66, 77).

Los efectos de la administración de N/OFQ sobre la nocicepción son contradictorios y dependen básicamente de la dosis y la vía de administración.

En los primeros estudios en que 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" (62, 91). Si la aplicación de N/OFQ se efectúa por vía intratecal (i.t.), se produce antinocicepción (20, 32, 102, 108).

Estudios subsecuentes en que se utilizaron métodos electrofisiológicos y de comportamiento mostraron que el efecto espinal de la N/OFQ es principalmente inhibitorio y produce antinocicepción en roedores (101, 110).

Por otro lado, Vanderah y cols. (1998) reportaron que no hay un efecto nociceptivo significativo dosis-dependiente cuando se aplican inyecciones i.t. e i.c.v. de N/OFQ, en dosis que van de 0.055 a 10 nM en ratones evaluados en la prueba de plancha caliente.

Minami y cols. (1997) encontraron que la prostaglandina D2 (PGD2) inhibe de manera dosis-dependiente a la alodinia inducida por N/OFQ, a través de los receptores a prostaglandinas D en la médula espinal; ellos mismos sugieren que la glicina puede estar involucrada en esta inhibición ya que ésta bloquea también la alodinia producida por la N/OFQ.

Rossi y cols. (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 al ser evaluados éstos con la prueba de presión de la

cola (*tail-flick*). El efecto hiperalgésico no es sensible a antagonistas opioides, pero el efecto analgésico sí, 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* (54, 63), 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 antiopioide

Mogil y cols. (1996a) demostraron mediante pruebas termonociceptivas, 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. Asimismo, la aplicación de N/OFQ i.c.v. en dosis de 0.1 a 10.0 nM revierte los efectos analgésicos inducidos por electroacupuntura de manera dosis-dependiente, en forma similar a la reversión de los efectos analgésicos inducidos por la morfina (19, 102). La tolerancia y la dependencia a la morfina se pueden atenuar o revertir por antagonistas o agonistas del ORL-1 (37).

La administración de N/OFQ vía i.c.v. en dosis 10 nM, 15 minutos después de la aplicación de la morfina reduce significativamente la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens* en estudios de microdiálisis, lo cual evidencia el papel modulador de la N/OFQ en este núcleo cerebral (27, 74). Otra de las posibles funciones moduladoras de la N/OFQ es sobre la liberación de Met-enkefalina (ME); en dosis bajas de N/OFQ (1-10 nM) inhibe la liberación y, en dosis altas (100-1000 nM), produce un incremento en la liberación de ME en el plexo mientérico de cobayo (28).

Locomoción y efecto muscular

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 (79, 90, 91). Florin y cols. (1996), con dosis menores (5-50 pM), pudieron inhibir o estimular la actividad locomotora y la conducta exploratoria en ratones. Estos efectos no son sensibles a la naloxona, pero son revertidos por antagonistas dopaminérgicos D₁ y D₂, lo que sugiere que puede ocasionarlos un incremento en la transmisión dopaminérgica. Con

dosis de 10 a 100 nM de N/OFQ vía i.c.v. se produce en ratas una pronunciada depresión locomotora, que incluye pérdida de la coordinación, balance y tono muscular. La tolerancia a estos efectos se desarrolla rápidamente al segundo o tercer día del tratamiento, y permanece durante aproximadamente siete días después de la última inyección de N/OFQ (21, 100). Sandin y cols. (1997) administraron N/OFQ (10 nM) directamente en hipocampo y reportaron una disminución en el tiempo de presentación de la conducta exploratoria con aumento en la locomoción en respuesta a estímulos nuevos. El efecto depresor de la locomoción parece ser específicamente supraespinal ya que, cuando las ratas reciben dosis de entre 0.5-10 nM de N/OFQ vía i.t., no presentan ninguna alteración locomotora (102, 108). Nishi y cols. (1997) sugieren que la N/OFQ no tiene un efecto tónico sobre la locomoción, ya que los ratones que carecen del gen del receptor ORL-1 no presentan anomalías en el comportamiento locomotor.

La N/OFQ actúa también como un neuromodulador de la motilidad gastrointestinal. Actúa en el sistema nervioso periférico y central, estimulando o inhibiendo la actividad mecánica en el estómago y colon, respectivamente (85).

En el músculo liso de la tráquea del cuyo y de la rata, la N/OFQ revierte la broncoconstricción producida por la estimulación con campos eléctricos (87).

Cardiovascular y renal

La administración de N/OFQ produce variaciones importantes en el corazón y la presión arterial (9, 29, 43), además de cambios en las funciones excretoras renales, como diuresis y antinatriuresis (43). Los experimentos realizados en ratas y ratones demostraron que administrar el péptido vía i.c.v. produce vasodilatación, hipotensión y bradicardia 30 segundos después de la inyección, y que el efecto dura entre 30 y 40 minutos (41, 42). La administración i.v. o i.t. a diferentes dosis de N/OFQ en el bulbo rostral ventrolateral produce los mismos efectos (9, 11, 16). En borregos se reportaron resultados opuestos, ya que en ellos la administración de N/OFQ produce hipertensión y aumento de la frecuencia cardíaca (3). La explicación a este cambio en la respuesta en el borrego sugiere que las variaciones en el tono autonómico basal entre especies animales contribuyen a dar respuestas paradójicas a la administración de N/OFQ, ya que los niveles de frecuencia cardíaca y de presión arterial son mucho menores en el borrego (68 ± 3 lpm

y 79 ± 3 mmHg) que en el ratón (551 ± 46 lpm y 112 ± 4 mmHg) y la rata (390 ± 10 lpm y 115 ± 5 mmHg) (42, 56). En condiciones en que predomina el tono simpático (ratas y ratones), la N/OFQ ejerce un efecto inhibitorio simpático y activa potencialmente el parasimpático. En condiciones de predominio parasimpático (borrego), existe la posibilidad de que la N/OFQ actúe periféricamente inhibiendo la neurotransmisión colinérgica, pero esta acción inhibitoria permite que prevalezca el efecto simpático, ya que el pretratamiento con phenoxybenzamina y propanolol atenúa la respuesta presora y taquicárdica (3). El grupo de Kapusta (40, 41, 42, 43) encontró respuestas cardiovasculares y renales semejantes en ratas tratadas con N/OFQ. Estos investigadores reportan una marcada disminución en la frecuencia cardíaca, un aumento en la presión arterial y una excreción del sodio urinario, así como un profundo incremento en la tasa del flujo urinario. Por lo anterior proponen que la N/OFQ interacciona con la liberación de hormonas del eje hipotálamo/hipofisario. Por otro lado, evidencias fisiológicas sugieren que la N/OFQ modula la liberación hormonal en el eje hipotálamo-hipofisario, inhibiendo la acción de las neuronas magnocelulares en el núcleo supraóptico y presumiblemente sobre la secreción de la oxitocina y la hormona antidiurética (39).

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 el sistema dopaminérgico (58, 59, 75). La pérdida del receptor ORL1 genera una ganancia en los procesos de memoria y en los mecanismos de potenciación de largo plazo en el área CA1. Lo anterior sugiere que la N/OFQ puede modular dichos procesos. Sin embargo, el incremento en la atención y la disminución en la latencia del aprendizaje pueden ser resultado de la supresión de la función dopaminérgica en el ratón *knockout* al receptor ORL1 (80).

Actividades antiestrés

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: variación de la intensidad de luz, laberintos, privación de alimento, etc. (31, 36). El grupo de Köster (1999) generó

ratones *knockout* para la N/OFQ, y así 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 neurobiológicos de la respuesta ante estímulos dañinos (31, 49).

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. En dosis bajas (1nM) incrementa significativamente la sensibilidad a la temperatura de las neuronas que responden a temperaturas medias, mientras que con concentraciones mayores (100 nM) disminuye 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 30 y 60 minutos después de la administración intrahipotalámica de N/OFQ.

Aspectos filogenéticos

La existencia de los péptidos opioides y sus receptores se ha documentado ampliamente a lo largo de la escala filogenética, abarca desde organismos unicelulares, invertebrados, protocordados y vertebrados al ser humano (17, 45, 53, 73, 84). Estos péptidos participan en funciones similares en organismos que presentan grupos taxonómicos diferentes y distantes. La expansión y la diversificación funcional de familias multigenes, como la de los opioides, ha sido tema recurrente en el estudio del éxito evolutivo de los organismos eucariontes complejos. Las moléculas precursoras de los péptidos opioides clásicos se encuentran codificadas en tres genes: la proopiomelanocortina (que origina la β-endorfina, MSH-peptidos asociados), la proencefalina (que origina como productos finales la Met-encefalina y la Leu-encefalina), la prodinorfina (que origina como productos finales a las dinorfinas y la α-neoendorfina) (38, 76, 80, 111). Con el descubrimiento de la N/OFQ (62, 91), el ligando endógeno del ORL-1 y de su molécula

precursora, la proorfana, se vio que con base en su organización molecular, el gen que codifica este precursor se relaciona evolutivamente con los genes de los precursores opioides clásicos. La proorfana de los mamíferos tiene la misma estructura intrón-exón, las cisteínas N-terminales y una modificación en la secuencia central opioide que es FGGF por YGGF, característica que define a los precursores opioides clásicos. También a nivel celular, tanto los opioides clásicos como la N/OFQ se acoplan a la forskolina para inhibir la actividad de la adenilato ciclasa, y los canales tipo N-Ca²⁺, y activa los canales de K⁺, permitiendo su salida. Por lo anterior se ha propuesto que el precursor de la N/OFQ y de los opioides clásicos se origina por duplicación secuencial de un gen ancestral común (17) y que divergencias subsecuentes de estas secuencias se procesaron en paralelo con sus proteínas receptoras. Los péptidos opioides se unen y activan a los receptores μ, δ, y κ con diferentes grados de especificidad; la N/OFQ se une únicamente al ORL-1, no se une con alta afinidad a los receptores opioides y no produce ningún efecto (60). En la síntesis *in vitro* de péptidos en que se producen alteraciones sistemáticas de uno o varios aminoácidos, se ha visto que, al remplazar la fenilalanina N-terminal de la N/OFQ por la tirosina característica de los péptidos opioides clásicos (89, 90), se produce un análogo de la N/OFQ que se une al receptor κ, con alta afinidad (1µM) y que produce un efecto agonista. Recientemente, Danielson y cols. (2001) reportaron que la organización de la proorfana del esturión *Acipenser transmontanus* (considerado un pez fósil viviente) contiene naturalmente la tirosina N-terminal, y es capaz de unirse al ORL-1 y a los receptores opioides con una afinidad casi igual. Este hallazgo ofrece evidencias de que el gen de la proorfana se encuentra en un estado intermedio en la evolución de esta familia de genes de los vertebrados. El estado molecular "fósil" del gen de la proorfana del esturión se puede considerar como una secuencia ancestral característica de donde se originan los genes de la prodinorfina o la proencefalina.

La N/OFQ y su receptor se han demostrado en la rata, el ratón y en el humano (66, 77, 98). Son pocos los trabajos en especies animales, que no sean mamíferos, en donde se demuestre la existencia de la N/OFQ y su receptor o su efecto; entre éstos están estudios hechos en fracciones de membrana cerebral de la *Rana esculenta*, que demostraron sitios de unión específicos a N/OFQ (5). En el molusco *Lymnaea stagnalis* se aisló el gen del receptor a N/OFQ, y por medio de una hibrida-

ción *in situ* se demostró que se expresa en neuronas identificadas que participan en varios sistemas, como la alimentación y el balance hidroelectrolítico (Saunders y cols., 2000). En el caracol *Cepaea nemoralis*, la inyección de N/OFQ tiene un efecto pronociceptivo (44). Nuestro grupo demostró la existencia de inmunoreactividad a N/OFQ en el ganglio nervioso periesofágico del caracol *Helix aspersa* con una distribución anatómica amplia. Corroboramos, además, el efecto pronociceptivo de la aplicación de la N/OFQ y el efecto antinociceptivo del antagonista del ORL-1, la Phe¹ψ(CH₂-NH)Gly²NC(1-13)NH₂, en este caracol por medio de la prueba de plancha caliente (54, 63, 95). Estos hallazgos apoyan el hecho de que este nuevo sistema opioide, la N/OFQ, y su receptor, el ORL-1, tienen un origen filogenético temprano y una continuidad funcional durante el curso de la evolución.

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En 1995 se identificaron el receptor ORL-1 (62) y su ligando endógeno, la N/OFQ (62, 91), y este hecho abrió un nuevo capítulo de investigación en el campo de los opioides, que ha motivado a la comunidad científica a dilucidar sus funciones. En los últimos años se publicaron más de 500 artículos sobre el tema. Lo anterior no resulta sorprendente debido a la gran variedad de efectos de este péptido y su posible papel en el control de varias funciones neurobiológicas, que incluyen no sólo la nocicepción, sino la motivación, el aprendizaje y la memoria; el estrés y la ansiedad; la regulación hormonal, y las funciones cardiovasculares, renales e intestinales.

El receptor ORL-1 y su péptido endógeno, la N/OFQ, se consideraron como miembros de la familia de los opioides por su gran homología estructural. Sin embargo, los opioides no se unen con alta afinidad al receptor ORL-1, así como tampoco la N/OFQ se une a ningún receptor opioide. La N/OFQ y los péptidos opioides tienen una distribución anatómica similar en el SNC, pero se localizan en circuitos neuronales separados (98). La N/OFQ activa las mismas vías de señalización intracelulares que los opioides, como las de las proteínas G_i que inhiben a la adenilato ciclasa y la entrada del calcio a la célula, y que estimulan la salida del potasio (4, 81, 105, 112). 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 es su efecto pronociceptivo (44, 54, 55, 61, 62) o su efecto al inhibir la analgesia mediada por opioides (19, 37, 67, 68, 102). Sin embargo, es claro que la inhibición que produce la N/OFQ en las neuronas inhibitorias puede dar como resultado un incremento de la actividad neuronal, dependiendo de la circuitería en donde actúe. En el mismo sentido, se sabe que la morfina produce una activación indirecta de las neuronas mesocorticolímbicas al inhibir a las neuronas gabaérgicas que producen una inhibición tónica sobre estas neuronas (22).

En el campo de la filogenia, Danielson y Dores (1999) propusieron la existencia de un gen ancestral que pudiera ser el precursor de la N/OFQ y de los opioides clásicos. Dichos investigadores encontraron que, debido a la organización de la pronociceptina, en el esturión *Acipenser transmontanus* la N/OFQ es capaz de unirse al ORL-1 y a los receptores opioides con una afinidad casi igual. Este hecho aporta la evidencia de que, en este esturión, el gen de la pronociceptina es una secuencia ancestral en la cual se pudieron haber originado los genes de la prodinorfina o la proencefalina. Por otro lado, en el molusco *Lymnaea stagnalis* se aisló el gen del receptor ORL-1 (97), y en los moluscos *Cepaea nemoralis* y *Helix aspersa* la inyección de N/OFQ surte un efecto pronociceptivo (44, 55) igual que en los mamíferos, por lo que tales evidencias apoyan el hecho de que este nuevo sistema opioide, la N/OFQ, y su receptor, el ORL-1, tienen un origen filogenético temprano y una continuidad funcional durante el curso de la evolución.

Debido al descubrimiento reciente de la N/OFQ y a la amplia distribución anatómica de este péptido y su receptor en el sistema nervioso, resulta obvio que aún es necesario investigar más a fondo su participación en la fisiología y sus probables implicaciones farmacológicas. El estudio de este sistema péptido receptor permitirá un mejor conocimiento de la fisiología cerebral. La elaboración de agonistas y antagonistas de naturaleza no peptídica puede aportar las herramientas necesarias para entender el papel del sistema ORL-1/N/OFQ en la fisiopatología, además de ayudar a encontrar nuevas aplicaciones terapéuticas, como en el manejo del dolor, de los líquidos corporales y la regulación neuroendocrina.

Agradecimientos

A los doctores Francisco Pellicer y Enrique Soto por la revisión del texto y sus comentarios. A Feliciano Camacho por su asistencia técnica. Esta revisión fue financiada parcialmente por el proyecto CONACYT 29151N, de León-Olea M.

REFERENCIAS

1. AKIL H, MENG D, DEVINE S, WATSON J: Molecular and neuroanatomical properties of the endogenous opioid system: implications for the treatment of opiate addiction. *Semin Neuroscience*, 9:70-83, 1997.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. BENYHE S, MONORY K, FARKAS J, TOTH G, GUERRINI R, SALVADORI S, OROSZ G, WOLLEMAN M, BORSODI A: Nociceptin binding sites in frog (*Rana esculenta*) brain membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 260(3):592-6, 1999.
6. BUNZOW J, SAEZ C, MORTURD M, BOUVIER C, WILLIAMS J, LOW M, GRANDY D: 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: *FEBS Lett*, 347:279-283, 1994.
7. BUTOUR J-L, MOISAND CH, MOLLEREAU C, MEUNIER J-C: Phe1(CH2-NH)Gly2Nociceptina(1-13)NH2 is an agonist of the nociceptin (ORL1) receptor: *Eur J Pharmacol*, 349:R5-R6, 1998.
8. CALO G, GUERRINI R, RIZZI A, SALVADORI S, REGOLI D: Pharmacology of nociceptin and its receptors: a novel therapeutic target. *Brit J Pharmacol*, 129:1261-83, 2000.
9. 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.
10. 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*, 347:279-283, 1994.
11. CHU X, XU N, LI P, WANG J: Profound inhibition of cardiomotor neurons in the rat rostral ventrolateral medulla by nociceptin (orphanin FQ). *Neuroreport*, 9:1081-84, 1999.
12. 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.
13. 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*, 119:1614-1618, 1996.
14. CONSTENTIN J, FLORIN S, SUAUDEAU C, MEUNIER J-C: Le clonage de la prénociceptine fait découvrir d'autres peptides biologiquement actifs. *C R Soc Biol*, 192:1099-1109, 1998.
15. CRUZ R, RAMIREZ S, LEON-OLEA M, ANTON B, SOTO E: Efecto de la nociceptina/orfanina FQ en neuronas de caracol *Helix aspersa*. XLII Congreso de la Soc. Mex. de Ciencias Fisiol. Res. C171. Universidad Autónoma de Zacatecas, 26-30 de septiembre, Zacatecas, 1999.
16. CZAPLA M, CHAMPION H, KADOWITZ P: Nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, has vasodilator activity in the hindquarters vascular bed of the rat. *Peptides*, 18(6):793-795, 1997.
17. DANIELSON P, DORES M: Molecular evolution of the opioid orphanin gene family. *Gen Comp Endocrinol*, 113:169-86, 1999.
18. 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*, 276(27):22214-22119, 2001.
19. 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.
20. DAWON-BASOA M, GINTZLER A: Nociceptin (Orphanin FQ) abolished gestational and ovarian sex steroid-induced antinociception and induces hyperalgesia. *Brain Res*, 750:48-52, 1997.
21. 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*, 21(11):1387-1396, 1996.
22. DI CHIARA G, NORTH RA: Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci*, 13(5):185-93, 1992.
23. DOOLEY C, HOUGHTEN R: Orphanin FQ/Nociceptin receptor binding studies. *Peptides*, 21:949-60, 2000.
24. EVANS CJ, KEITH DE, MORRISON H, MAGENDZO K, EDWARDS RH: Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, 258(5090):1952-5, 1992.
25. FLORIN S, SUAUDEAU C, MEUNIER J-C, COSTENTIN J: Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. *Eur J Pharmacol*, 317:9-13, 1996.
26. FUKUDA K, KATO S, MORI K, NISHI M, TAKESHIMA H, WABW N, MIYATA T, HOUTANI T, SGIMOTO T: cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FESB Lett*, 342:42-46, 1994.
27. GIANNUARIO D, PIERETTI S, CATALANI, LOIZZO A: Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis in rats. *Neurosci Lett*, 272:186-187, 1999.
28. 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.
29. 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.
30. GRANDY K: 27th Meeting of Internatl. Narcot Res Conf (INRC) Abstr, 29:S3, 1996.
31. GRIEBEL G, PERRAULT G, SANGER D: Orphanin FQ, a novel neuropeptide with anti-stress-like activity. *Brain Res*, 836:221-224, 1999.
32. 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.
33. HAWES B, GRAZIANO M, LAMBERT D: Cellular actions of nociceptin: transduction mechanisms. *Peptides*, 21:961-67, 2000.
34. 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.

35. JENCK F, MOREAU J, MARTIN J, KILPATRICK G, REINSCHEID 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.
36. 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.
37. JHAMANDAS K, SUTAK M, HENDERSON G: Antinociceptive and morphine modulatory actions of spinal orphanin FQ. *Can J Pharmacol*, 76:314-324, 1998.
38. KAKIDANI H, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, NODA H, MARIMATO Y, HIROSE T, ASAI M: Cloning and sequence analysis of cDNA for poreine β -neoendorphin-dynorphin precursor. *Nature*, 298:245-249, 1982.
39. KAKIYA S, MURASE T, ARIMA H, YOKOI H, IWA-SAKI Y, MIURA Y, OISO Y: Role of endogenous nociceptin in the regulation of arginine vasopressin release in conscious rats. *Endocrinol*, 141:4466-4471, 2000.
40. KAPUSTA D: Neurohumoral effects of orphanin FQ/nociceptin: relevance to cardiovascular and renal function. *Peptides*, 21:1081-1099, 2000.
41. 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.
42. KAPUSTA D, CHANG J, KENIGS V: Central administration of [Phe¹(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*, 289(1): 173-180, 1999.
43. KAPUSTA D, SEZEN S, CHANG J-K, LIPPTON H, KENIGS V: Diuretic and antinatriuretic responses produced by the endogenous opioid-like peptide, nociceptin (orphanin FQ). *Life Sci*, 60(1):15-21, 1997.
44. KAVALIERS M, PERROT-SINAL S: Pronociceptive effects of the neuropeptide nociceptin in the land snail *Cepaea nemoralis*. *Peptides*, 17(5):763-768, 1996.
45. KAVALIERS M: Evolutionary and comparative aspect of nociception. *Brain Res Bull*, 21:923-931, 1988.
46. KEITH D, MAUNG T, ANTON B, EVANS C: Isolation of cDNA clones homologous to opioid receptors. *Reg Peptides*, 54:143-144, 1994.
47. KIEFFER BL: Molecular aspects of opioid receptors. En: Dickerson A, Besson J-M (Eds.). *Pain, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, 130:281-303, Berlin, 1997.
48. 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.
49. KÖSTER A, MONTKOWSKI A, SCHULZ S, STUBE E, KNAUDT K, JENCK F, MOREAU J, NOTHACKER H, CIVELLI O, REINSCHEID 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.
50. LANCHOWICZ JE, SHEN Y, MONSMA FJ, SIBLEY DR: Molecular cloning of a novel G protein-coupled related to the opiate receptor family. *J Neurochem*, 64:34-40, 1994.
51. LEFF P, MARTINEZ I, ACEVEDO R, CALVA J, LEON-OLEA M, CRUZ S, ANTON B: A comprehensive immunohistochemical mapping of nociceptin/orphanin FQ peptide in the CNS of rat. *Neurosci Abst*, 24(1):854, 1998.
52. LEFF P, MARTINEZ I, ACEVEDO R, CALVA J, LEON-OLEA M, CRUZ S, ANTON B: A comprehensive immunohistochemical mapping of nociceptin/orphanin FQ peptide in the CNS of rat methods finder. <http://www.methodsfinder.org>, 1999.
53. LEROIT D, LIOTTA A, ROCH J, SHILOACH J, LEWIS M, PERT C, KREIGER D: Corticotropin and B-endorphin like materials are native to unicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:2086-2090, 1982.
54. LEON-OLEA M, MILLER-PEREZ C, SANCHEZ-ISLAS F, ANTON B, PELLICER F, MUCIO-RAMIREZ 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) Junio 27-30, Estambul, 2001.
55. LEON-OLEA M, MILLER-PEREZ C, SANCHEZ-ISLAS E, PELLICER F, ANTON B, MUCIO-RAMIREZ S: Caracterización anatómica y funcional de la nociceptina/orfanina FQ en los ganglios periesofágicos del caracol *Helix aspersa*. I Congreso de responsables de Proyectos de Investigación en Ciencias Naturales, CONACYT. Veracruz, 8-11 de octubre, México, 2000.
56. MADEDDU P, SALIS M, MILIA A: Cardiovascular effects of nociceptin in unanesthetized mice. *Hypertension*, 33:914-9, 1999.
57. MARCHESE A, DOCHERTY JM, NGUYEN T, HEIBER M, CHENG R, HENG HH, TSUI I, SHI X, GEORGE S, O'DOWN F: Cloning of human genes encoding novel G protein-coupled receptors. *Genomics*, 23:609-618.
58. MAMIYA T, NODA Y, NISHI M, TAKESHIMA H, NA-BESHIMA T: Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice. *Brain Res*, 783:236-240, 1998.
59. MENABE T, NODA Y, MAMIYA T, KATAGIRI H, HOUTANIT IM, NODA T, TAKAHASHI T, SUGIMOTO T, NABESHIMA T, TAKESHIMA H: Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature*, 394(6):577-581, 1998.
60. MENG F, TAYLOR LP, HOVERSTEN MT, UEDA Y, ARDATI A, REINSCHEID RK, MONSMA FJ, WATSON SJ, CIVELLI O, AKIL H: Moving from the orphanin FQ receptor to an opioid receptor using four point mutations. *J Biol Chem*, 271(50):32016-20, 1996.
61. MEUNIER J: Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor like ORL1 receptor. *Eur Jour Pharmacol*, 340:1-15, 1997.
62. 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*, 377:532-534, 1995.
63. MILLER-PEREZ C, BUCIO-PACHECO V, MUCIO-RAMIREZ S, ANTON B, LEON-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. 3-7 de septiembre, Cancún, Méx. 2000.
64. 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.
65. MINAMI T, HOSOI Y, TOYA T, KATAO Y, MAEKAWA K, KATSUMATA S, YABUUCHI K, ONOGI T, SATOH M: In situ hybridization of κ -opioid receptor mRNA in the rat brain. *Neurosci Lett*, 162:161-164, 1993.
 66. 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 immuno-histochemical study. *Med Sci Res*, 26:403-405, 1998.
 67. MOGIL J, GRISEL J, BELKNAP J, GRANDY D, REINSCHIED R, CIVELLI O: Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience*, 75:333-7, 1996.
 68. 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, 1996.
 69. MOLLEREAU C, PARMENTIER M, MAILLEUX P, BUTOUR L, MOISAND C, CHALON P, CAPUT D, VASSART G, MEUNIER J-C: ORL-1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning functional expression, and localization. *FEBS Lett*, 341:33-38, 1994.
 70. MOLLEREAU C, SIMONS M-J, SOULARUES P, LINERS F, VASSARY G, MEUNIER J-C, PARMENTIER M: Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:8666-8670, 1996.
 71. 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.
 72. MORAN T, ABDULLA F, SMITH P: Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides*, 21:969-76, 2000.
 73. 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.
 74. MURPHY N, LY T, MAIDMENT N: Intracerebroventricular orphanin FQ/nociceptin suppresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats. *Neuroscience*, 75:1-4, 1996.
 75. NABESHIMA T, NODA Y, MAMIYA T: The role of nociceptin in cognition. *Brain Res*, 848:167-173, 1999.
 76. NAKANISHI S, INOUE A, KITO T, NAKAMURA M, CHANG C, COHEN U, NUMA S: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. *Nature*, 278:423-427, 1979.
 77. NEAL R, MANSOUR A, REINSCHIED R, NOTHACKER H, CIVELLI O, STANLEY J, 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.
 78. NISHI M, TAKEISHIMA H, MORI M, NAKAGAWARA K, TAKEUCHI T: Structure and chromosomal mapping for the mouse κ -opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C). *Biochem Biophys Res Commun*, 205:1353-57, 1994.
 79. NOBLE F, ROQUES B: Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice. *FEBS Lett*, 401:227-229, 1997.
 80. NODA M, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, TOYO-SATO M, HIROSE T, INAYAMA S, NAKANISHI S, NUMA S: Cloning and analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*, 295:202-206, 1982.
 81. NORTH A, WILLIAMS J, SUPRENANT A, CHRISTIE J: Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:5487-5491, 1987.
 82. 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.
 83. 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*, 392(19):286-289, 1998.
 84. OLSON R, ABBA K: Endogenous opiates: a review. *Peptides*, 17:1421-1466, 1966.
 85. OSINSKI M, BROWN RD: Orphanin FQ/Nociceptin: a novel neuromodulator of gastrointestinal function? *Peptides*, 27:999-1005, 2000.
 86. PAN Y-X, XU J, PASTERNAK G: Cloning and expression of a cDNA encoding a mouse brain orphanin FQ/nociceptin precursor. *Biochem J*, 315:11-13, 1996.
 87. PEISER CH, UNDEM B, FISCHER A: Nociceptin effect in the airways. *Peptides*, 27:995-998, 2000.
 88. QUINGLEY D, McDOUGALL, 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.
 89. 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.
 90. 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.
 91. REINSCHIED K, NOTHACKER H-P, BUNZOW J-R, GRANDY K, LANGEN H, MONSAMA FJ Jr, CIVELLI O: Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor. *Science*, 220:792-794, 1995.
 92. 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*, 7(8):1369-1372, 1996.
 93. ROSSI G, LEVENTHAL L, PASTERNAK G: Naloxone sensitive orphanin FQ-induced analgesia in mice. *Eur J Pharmacol*, 311: R7-R8, 1996.
 94. SAITO Y, MARUYAMA K, SAIDO T, SEIICHI K: 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.
 95. SANCHEZ-ALVAREZ M, ANTON B, SANCHEZ-ISLAS E, LEON-OLEA M: Distribution of orphanin FQ-like immunoreactivity in the periesophageal ganglia of the snail *Helix aspersa*. *Neurosci Abstr*, 23(1):980, 1997.
 96. 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.
 97. 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.
98. SCHULZ S, MATTHIAS S, NUB D, GRAMSCH CH, VOLKER H: Nociceptin/orphanin FQ and opioid peptides show overlapping distribution but not colocalization in pain-modulatory brain regions. *Neuroreport*, 7:3021-5, 1996.
 99. STRAND F: *Neuropeptides: Regulators of Physiological Processes*. MIT Press, 658, Londres, 1999.
 100. STRATFORD T, HOLAHAN M, KELLEY A: Injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake. *Neuroreport*, 8:423-426, 1997.
 101. TAYLOR F, DICKERSON A: Nociceptin/orphanin FQ. A new opioid, a new analgesic? *Neuroreport*, 8:65-70, 1998.
 102. TIAN J, XU W, ZHANG W, FANG Y, GRISEL J, MOGIL J, GRANDY D, JI-SHENG H: Involvement of endogenous orphanin FQ in electroacupuncture-induced analgesia. *Neuroreport*, 8(2):497-500, 1997.
 103. UHL G, CHILDERS S, PASTERNAK G: An opiate-receptor gene family reunion. *Trends Neurosci*, 17:89-93, 1994.
 104. VANDERAH T, RAFFA R, LASHBROOK J, BURRIT A, HRUBY V, FRANK P: Orphanin-FQ/nociceptin: lack of antinociceptive, hyperalgesic or allodynic effects in acute thermal or mechanical test following intracerebroventricular or intrathecal administration to mice or rats. *Eur J Pain*, 2: 267-280, 1998.
 105. 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.
 106. WANG JB, JOHNSON PS, PERSICO AM, HAWKINS AL, GRIFFIN CA, UHL GR: Human μ opiate receptor cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FESB Lett*, 338:217-222, 1994.
 107. 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. *Mol Brain Res*, 27:37-44, 1994.
 108. 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.
 109. YAKIMOVA K, PIERAU F: Nociceptin/orphanin FQ: effects on thermoregulation in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 21(5):345-52, 1999.
 110. YAMAMOTO T, NOZAKI-TAKAGUCHI N, SAKASHITA Y, KIMURA S: Nociceptin/orphanin FQ, role in nociceptive information processing. *Prog Neurobiol*, 57:527-35, 1999.
 111. YANG H, HEXUM T, COSTA E: Opioids in adrenal glands.
 112. YASUDA K, ESPINOSA R, TAKEDA J, KE B, BELL G: Localization of the kappa opioid receptor gene to human chromosome band 8q11.2. *Genomics*, 19:596-597, 1994.

Immunohistochemical localization and electrophysiological action of nociceptin/orphanin-FQ in the snail (*Helix aspersa*) neurons

Martha León-Olea^a, Carolina Miller-Pérez^a, Ricardo Cruz^b, Benito Antón^a,
Rosario Vega^b, Enrique Soto^{b,*}

^aInstituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente", Av. México-Xochimilco 101, CP 14370, México, DF, México

^bInstituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, Apartado Postal 406, Puebla, Pue 72000, México

Received 29 August 2001; received in revised form 15 October 2001; accepted 16 October 2001

Abstract

We report the existence and anatomical distribution to nociceptin/orphanin-FQ (N/O FQ)-like immunoreactivity in neurons and fibers in the perioesophageal ganglia of the snail (*Helix aspersa*). Intracellular recordings from perioesophageal ganglion neurons showed that the application of 10 μ M N/O FQ produced an excitatory action in 22% of the neurons studied and an inhibitory action in 33% of the neurons regardless of their origin (cerebral or parietal ganglion). Our result provides evidence that N/O FQ-like peptide is located in whole perioesophageal ganglia (mainly in the cerebral one), and that it may serve as a neuromodulator of the neuronal spike discharge. These data support the idea that the N/O FQ opioid system has an early phylogenetic origin and a functional continuity during the course of evolution. © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Opioid; Neuropeptides; Nociception; Analgesia; Snail anatomy; Neurotransmission

The peptide nociceptin, also called orphanin-FQ (N/O FQ), has been reported to be an endogenous agonist for an orphan, opioid receptor like-1 (ORL-1). This peptide has been suggested to have both pronociceptive hyperalgesic functions and also antinociceptive, analgesic effects. The N/O FQ action in mammals, either hyperalgesic or analgesic, depends on the dose and on the route of administration of the peptide.

In molluscs, opioid peptides have been shown to regulate various functions, including locomotion [2], thermal regulation [6], alimentary behaviour [7], immune system function [18], and nociception [9].

It has been shown that leu- and met-enkephalin are distributed in various regions of the snail ganglion [12], and that leu- and met-enkephalins are released from the perioesophageal ganglia of the snail by K^+ -induced depolarization [15].

Electrophysiological studies have shown that opioid peptides produced both excitatory and inhibitory actions in snail ganglion neurons [1]. Naloxone also produced both excitatory and inhibitory actions in the parietal ganglion neurons of the snails *Helix aspersa* [4] and *Helix locuorum* [16].

It has been proposed that opioid peptides participate in both analgesic and pronociceptive processes in invertebrates. The application of morphine increased the response latency to thermal stimuli in *Cepaea nemoralis* [8]. In contrast N/O FQ had significant, dose-related pronociceptive effects in the land snail, reducing the latency of response to thermal stimuli [9,13]. However, repeated daily administrations of N/O FQ resulted in reduced pronociceptive effects, suggestive of the development of tolerance to the hyperalgesic actions of this opioid-related peptide [9].

The aim of this study was to examine the distribution of N/O FQ in the perioesophageal ganglion neurons of the land snail (*Helix aspersa*) and to study the effects of N/O FQ on the electrical activity of ganglion neurons.

Adult land snails, *Helix aspersa*, were used in this study. Animal housing and experimental procedures were done according to the declaration of Helsinki. Snails were sacrificed and the perioesophageal ring was dissected and fixed in a 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid solution in phosphate buffer saline (PBS 0.1 M, 0.9% NaCl, pH 7.4, 4°C) and kept in this fixative for 4 h. The tissue was cryoprotected by immersion in a 30% sucrose solution overnight, cut serially in freezing microtome (Cryostat, Leitz) into 15 μ m thick coronal sections and mounted on gelatinized glass slides. Each slide included homologous tissue

* Corresponding author. Fax: +52-222-33-4511.
E-mail address: esoto@siu.buap.mx (E. Soto).

from one or two animals. To block endogenous peroxidase activity, the sections were incubated with 0.003% H_2O_2 for 30 min. Afterwards, unspecific sites were blocked by incubating tissue sections with 5% bovine serum albumin (BSA) and 5% normal donkey serum dissolved in phosphate buffer. Then immunostaining was done by incubating the tissue slides for 12 h at 4°C in a solution containing the primary antibody (1:150) in 0.1 M PBS, 0.3% Triton X-100, 1% BSA, and 1% normal donkey serum. Primary antibody was generated against the full-length sequence of N/O FQ and was purified by affinity chromatography [5]. Tissue sections were rinsed three times and incubated in a biotinylated donkey anti-rabbit IgG (Jackson Lab.) during 2 h at

37°C. Then tissue slices were treated for Avidin-Biotin-Peroxidase (Vector Labs) revealed using diaminobenzidine tetrahydrochloride (10 mg) in 1 μ M PBS, 0.003% H_2O_2 and 0.03% nickel sulphate. Three types of controls were performed: (1) omission of primary antibody; (2) omission of secondary antibody, which was substituted with normal donkey serum and PBS-Triton; and (3) preadsorption of primary antibody with an excess (100 μ M) of synthetic N/O FQ peptide. Serial sections were assigned to test and control groups. Tissue sections were rinsed and dried overnight and dehydrated in an ethanol series and mounted with synthetic resin. Some slides were counterstained with safranine (0.01%). The sections were analyzed in a light micro-

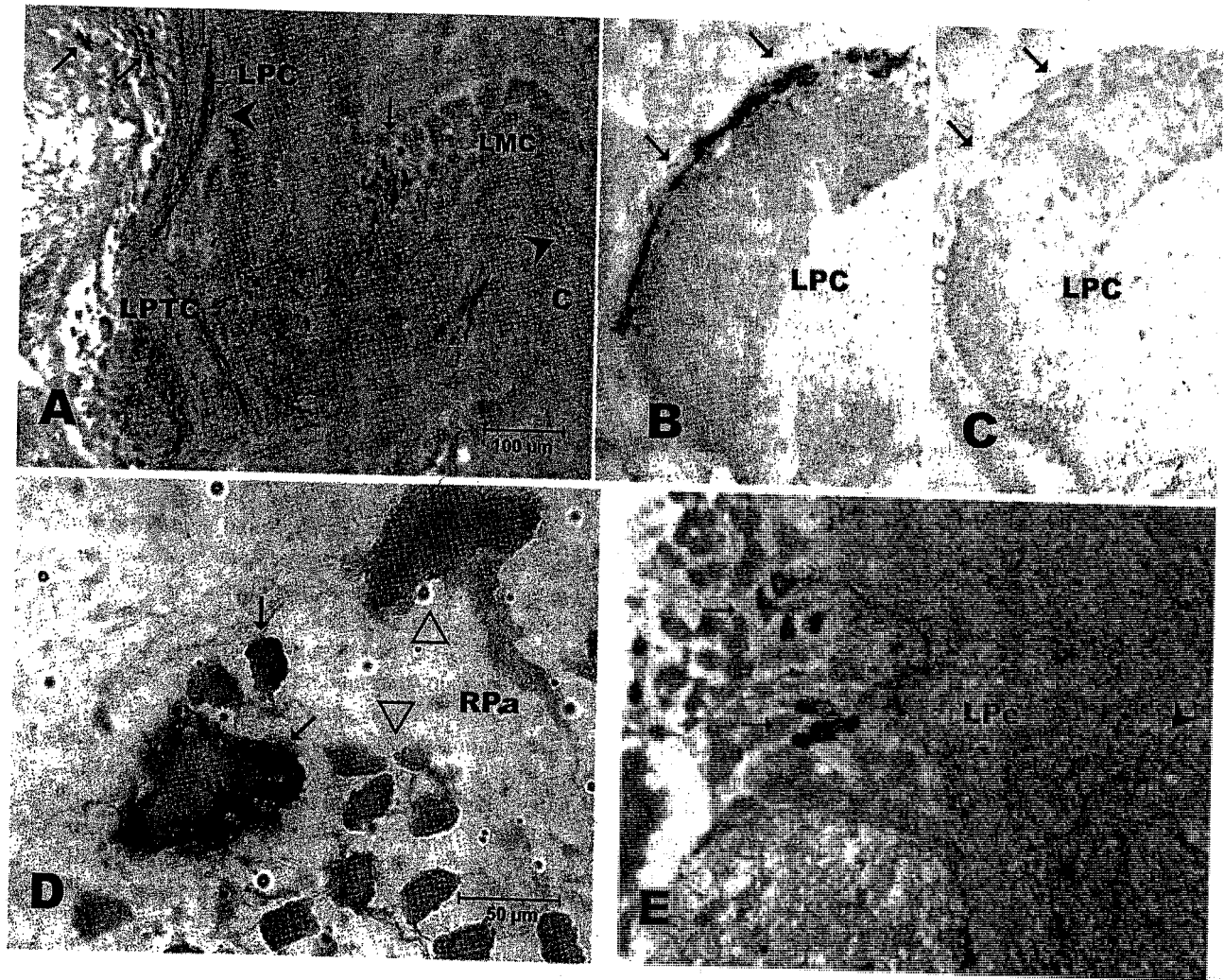


Fig. 1. Immunoreactivity to N/O FQ in periesophageal ganglia of *Helix aspersa*. The black staining indicates the immunoreactivity in neurons (ir-neurons) and fibers (ir-fibers). (A) Section through the left cerebral ganglia showing a group of small ir-neurons in the lateral zone of the procerebrum (LPC, arrows) and a group of small ir-neurons in the lateral varicose ir-fibers in the neuropile of postcerebrum (LPTC), procerebrum and some ir-fibers in cerebral commissure (C, arrowheads) are also seen. (B,C) Two consecutive sections through the left procerebrum. In (B), notice the ir-neurons in the marginal zone (arrows). (C) Preadsorption control showing the absence of immunoreactivity. The calibration bar shown in (A) also applies to (B,C). (D) Section of the right parietal ganglia (RPa) showing a large and some small ir-neurons in the dorsomedial region (arrows). The section shows some ganglia (LPe) showing a group of small ir-neurons in the lateral part of the ganglion (arrows) and abundant ir-fibers in the neuropile (arrowhead).

scope Leitz Laborlux 12 and photographed with a SPOT 2 digital camera (Diagnostic Instruments, Inc.). For illustration, contrast and brightness were adjusted and CorelDraw 8 was used for figure composition and labelling.

For the electrophysiological experiments the perioesophageal ganglion ring was dissected from the snail and the outer connective tissue was removed. The ganglion mass was then transferred to a recording chamber (3 ml volume) and pinned to the bottom. The preparation was continuously perfused by gravity flow (3 ml per min) with snail saline solution (in mM) (75 NaCl, 4 KCl, 5 CaCl₂, 0.005 MgCl₂, 7 HEPES, pH adjusted to 7.4).

Intracellular recordings were made using glass microelectrodes filled with 3 M potassium chloride with resistance between 80 and 120 MΩ. The electrical signals were led to a DC bridge amplifier (Axoprobe 1A, Axon Instruments), displayed in an oscilloscope (Tektronix 2214) and stored in a tape recorder (Vetter, 3000A). On-line digitalization was performed by means of a 12 bits analog-to-digital converter (LabMaster DMA), and ad-hoc programs developed in our laboratory [19]. The digitalization sampling rate was either at 10 KHz to analyze action potential characteristics, or at 300 Hz to study the spike discharge pattern and its changes due to drug application. N/O FQ was isolated from rat brain [11], dissolved in 1% BSA, and applied by pressure ejection of 100 μl from a pipette located in the vicinity of the cell under recording. Although significant drug dilution occurs after ejection from the pipette, concentrations in this work are expressed as the original concentration in the pipette. In some of the experiments 3 μM bacitracin (Sigma) was also added to the N/O FQ solution. Bacitracin was used as a peptidase inhibitor [17].

The interspike intervals were analyzed by means of frequency and interval histograms. The action potential

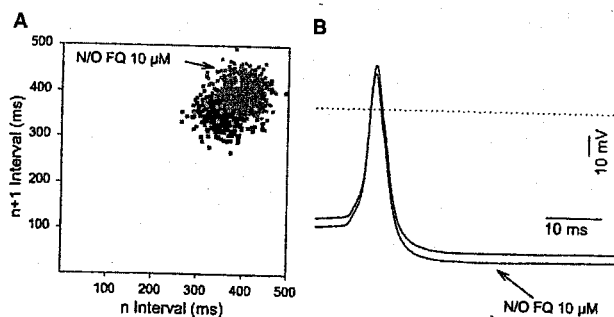


Fig. 2. Intracellular recording of the effects of N/O FQ application in a parietal ganglion neuron. (A) Graph showing the interval joint distribution (Poincaré diagram) of a neuron spike discharge before (black) and after (grey) N/O FQ 10 μM application. The mean interval increased from 350 to 400 ms indicating the inhibitory action of the drug. (B) A record showing an average of ten action potentials from the same neuron in control conditions and after the application of 10 μM N/O FQ. Immediately after N/O FQ application, the membrane potential was hyperpolarized in 4 mV, leading to a decrease in the spike discharge. No significant change in the action potential waveform (depolarization and repolarization rate, action potential duration) was found.

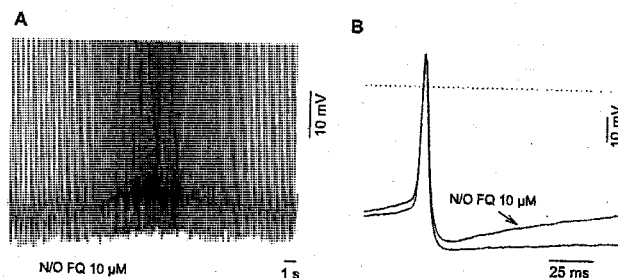


Fig. 3. Intracellular recording of the effects of N/O FQ application in a parietal ganglion neuron. (A) A record showing the excitatory action produced by N/O FQ 10 μM application. The cell depolarized in about 4 mV and the interspike interval changed from a mean of 400 to 200 ms. (B) High resolution digitization showing an average of ten action potentials in the control condition and after N/O FQ 10 μM application. The action potential depolarization and repolarization rate and its amplitude did not change. The mean membrane potential varied from -51 to -55 mV; the slope of the after hyperpolarization varied from 0.04 to 0.13 mV/ms.

waveform was measured from high time resolution records by using an average of at least three action potentials. These variables were measured in control conditions and after drug application [19].

Immunohistochemistry to N/O FQ was studied in the perioesophageal ganglia of the snail ($n = 16$). The N/O FQ antibody produced a strong bilateral symmetric reaction in the cerebral ganglia where intensely stained fibers and neuronal cell bodies can be clearly distinguished (Fig. 1A–C). The parietal (Fig. 1D), the pedal (Fig. 1E), the pleural, and the visceral ganglia were also stained by the N/O FQ antibody, although the staining in these regions had a lower density than that found in the cerebral ganglia. Controls produced no staining and were clearly differentiated from the experimental slides.

The electrical activity of neurons was recorded in control conditions and after N/O FQ microperfusion. Data were obtained from neurons having resting potentials more negative than 40 mV. A total of 48 neurons were recorded from the snail perioesophageal ganglia, 24 were from the cerebral ganglia (neurons 48, 49 and 50) and the rest were from the parietal ganglia (usually neurons 60, 61, 63 or 80–84) according to the neuron classification of Kerkut et al. [10]. Of the cerebral ganglion neurons 45% of the cells showed no spontaneous spike discharge. As a control, 3 μM bacitracin was applied ($n = 3$). It produced no significant modification of the action potential waveform, nor of the firing frequency of the neurons studied. N/O FQ was applied at concentrations of 1, 10 and 50 μM. At the lowest concentration (1 μM, $n = 14$) N/O FQ did not significantly modify the action potential waveform, nor the firing frequency of the neurons studied. When applied at 10 μM ($n = 9$) N/O FQ produced an inhibitory action in 33% of the neurons studied (Fig. 2) and an excitatory action in 22% of them (Fig. 3), regardless of their origin (cerebral or parietal ganglion). At 50 μM ($n = 4$) N/O FQ induced inhibitory actions in 50% of the recorded neurons

(all of them from the parietal ganglion). No excitatory action of N/O FQ was seen in these experiments.

Our results corroborate that the N/O FQ-related opioid system has a complex and widespread distribution in the periesophageal ganglion of the snail, indicating that it evolved very early during the phylogenetic evolution. To our best knowledge, this is the first description of N/O FQ distribution and electrophysiological actions in the snail neurons. Our data indicate that a N/O FQ-like peptide is produced by neurons of the periesophageal ganglion of the snail, and that N/O FQ is capable of modulating the spike activity of neurons in the snail central nervous system. The N/O FQ concentrations used in our work were higher than those that have been used in behavioural studies in the snail where concentrations used correspond to a range of 27 nM to 2.8 μ M [9]. However, in our experiments important dilution of the drug will take place immediately after ejection (the chamber volume is 3 ml, and hence the drug will dilute 30 times).

Whether N/O FQ affects the neuron discharge by a direct interaction with the membrane ORL-1 receptor cannot be unambiguously addressed on the basis of the present results. Though it has been demonstrated that N/O FQ has mainly inhibitory effects, it seems feasible that the mixed inhibitory excitatory action of N/O FQ reported here may be due to the fact that we are not necessarily recording from the neurons possessing the ORL-1 receptors; thus, very probably, excitatory actions are secondary to a disinhibition of the neuron under recording. Mixed inhibitory and excitatory actions of N/O FQ have also been found in rats, where N/O FQ is primarily pronociceptive in the female and primarily antinociceptive in the male [3]. The N/O FQ actions depend in a complex fashion on the activation state of other opioid receptors. In rat brain slices it has been shown that in animals experiencing opioid-induced analgesia N/O FQ increased pain sensitivity, but in animals experiencing opioid withdrawal N/O FQ decreased pain sensitivity. Thus, N/O FQ can have bidirectional effects, depending on the state of the animal [14].

Our results show that N/O FQ has a widespread distribution in the periesophageal ganglion of the snail. The actions of N/O FQ on the action potential discharge of the snail neurons may constitute the basis of the behavioural actions of N/O FQ, which are complex and very probably state-dependent, based on both excitatory and inhibitory actions exerted upon different neuronal pathways.

The authors wish to thank Augustine Udeh for proof reading the English manuscript. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant 35525-N to E.S. and 21151-N to M.L.-O.

- [1] Bezrukova, L.V. and Solntseva, E.I., Naloxone-dependent morphine-induced depression of the snail response to serotonin, *Neurofiziologia*, 13 (1981) 589–593.
- [2] Burrowes, W.R., Assanah, P. and Stefano, G.B., Behavioral effects of opiates on the land snail *Helix aspersa*, *Life Sci.*, 33 (Suppl. 1) (1983) 381–384.
- [3] Flores, C.A., Wang, X.M., Zhang, K.M. and Mokha, S.S., Orphanin FQ produces gender-specific modulation of trigeminal nociception: behavioral and electrophysiological observations, *Neuroscience*, 105 (2001) 489–498.
- [4] Gutiérrez, R., Effects of naloxone on membrane potential of identified neurons of *Helix aspersa*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 101C (1992) 425–431.
- [5] Gutiérrez, R., Leff, P., Romo-Parra, H., Acevedo, R. and Anton, B., Orphanin-FQ nociceptin inhibits kindling epileptogenesis and enhances hippocampal feed-forward inhibition, *Neuroscience*, 105 (2001) 325–333.
- [6] Kavaliers, M. and Hirst, M., The presence of an opioid system mediating behavioral thermoregulation in the terrestrial snail *Cepaea nemoralis*, *Neuropharmacology*, 23 (1984) 1285–1289.
- [7] Kavaliers, M. and Hirst, M., Slugs and snails opiate tales: opioids and feeding behaviour in invertebrates, *Fed. Proc.*, 46 (1987) 168–172.
- [8] Kavaliers, M., Hirst, M. and Teskey, G.C., A functional role for an opiate system in snail thermal behavior, *Science*, 220 (1983) 99–101.
- [9] Kavaliers, M. and Perrot-Sinal, T.S., Pronociceptive effects of the neuropeptide, nociceptin, in the land snail, *Cepaea nemoralis*, *Peptides*, 17 (1996) 763–768.
- [10] Kerkut, G.A., Lambert, J.D.C., Gayton, R.J., Loker, J.E. and Walker, R.J., Mapping of nerve cells in the suboesophageal ganglia of *Helix aspersa*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 50A (1975) 1–25.
- [11] Kowalczyk, C. and O'Shea, M., Solid-phase synthesis of neuropeptide by Fmoc strategies, In B.G. Irvine and H.C. Williams (Eds.), *Neuropeptide Protocols, Methods in Molecular Biology*, 73, Humana Press, Totowa, NJ, 1997, pp. 41–48.
- [12] León-Olea, M., Los péptidos opioides como proteínas ancestrales: estudio inmunohistoquímico en el molusco *Helix aspersa* y el anfibio *Ambystoma mexicanum*, In F. Pellicer (Ed.), *Péptidos Opioides*, Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Mexico, 1993, pp. 1–13.
- [13] León-Olea, M., Miller-Pérez, C., Sánchez-Islas, E., Antón, B., Pellicer, F. and 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, Istanbul, Turkey, 2001, Abstract BR10, pp. 196.
- [14] Pan, Z., Hirakawa, N. and Fields, H., A cellular mechanism for the bidirectional pain-modulating actions of orphanin FQ/nociceptin, *Neuron*, 26 (2000) 515–522.
- [15] Pellicer, F., Asai, M., León-Olea, M. and Sánchez-Álvarez, M., *In vitro* release of immunoreactive met and leu-enkephalins in whole periesophageal ganglia of *Helix aspersa*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 104 (1993) 323–325.
- [16] Romanenko, O.K., Pivovarov, A.S. and Bakalkin, G., Effect of opiate antagonist naloxone on the electrical activity of identified neurons in the edible snail, *Nuachnye Doki Vyss Shkoly Biol. Nauki*, 6 (1987) 50–55.
- [17] Roussi, N., Nantel, F., Drapeau, G., Rhaleb, N.E., Dion, S. and Regoli, D., Inhibitors of peptidases: how they influence the biological activities of substance P, neurokinins, kinins and angiotensin in isolated vessels, *Pharmacology*, 40 (1990) 185–195.
- [18] Sonetti, D., Ottaviani, E. and Stefano, G.B., Opiate signaling regulates microglia activities in the invertebrate nervous system, *Gen. Pharmacol.*, 29 (1997) 39–47.
- [19] Soto, E., Manjarrez, E. and Vega, R., A microcomputer program for automated neuronal spike detection and analysis, *Int. J. Biomed. Informat.*, 44 (1997) 203–212.