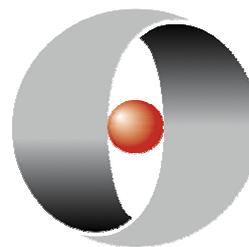


**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS
DE CASTILLA Y LEÓN (INCYL)**

***El receptor tipo opioide ORL1 en los GASH/Sal, una nueva línea
de Hámsters Sirios con epilepsia audiógena***

**Memoria presentada por Luis Fernando Barrios Rodríguez
para optar al título de doctor por la Universidad de Salamanca**

Fdo: Luis Fernando Barrios Rodríguez



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS
DE CASTILLA Y LEÓN (INCYL)

M^a Dolores E. López García y Raquel E. Rodríguez Rodríguez,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “**El receptor tipo opioide ORL1 en los GASH/Sal, una nueva línea de Hámsters Sirios con epilepsia audiógena**”, ha sido realizado bajo su dirección por D. Luis Fernando Barrios Rodríguez en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León de la Universidad de Salamanca y consideramos que reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, 15 de Mayo de 2008

Fdo: Dra. M^a Dolores E. López García Fdo: Dra. Raquel E. Rodríguez

Este trabajo ha sido subvencionado por los Proyectos MEC (BFU2007-65210/BFI y CIT-390000-2005-4)

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras de tesis María Dolores E. López y Raquel E. Rodríguez, por permitirme realizar este trabajo y llevarlo a feliz término y a la oportunidad que me dieron de implicarme en el estudio de los fenómenos biológicos que ocurren en los sistemas nerviosos.

Quiero también agradecer al Director del INCyL Prof. Merchán y al director del programa de Doctorado, Prof. Yajeya, por permitirme ser parte del Doctorado de Neurociencias y por todo su apoyo. Gracias también a Melissa, y a los doctores Orlando Castellano, Verónica González, Luis Muñoz y Javier Herrero Turrión, por el apoyo prestado en la parte experimental; sin su trabajo, esta tesis no hubiera sido posible. Al Dr. Enrique López-Poveda por permitirme trabajar con él, en el primer periodo del doctorado.

A mis compañeros de laboratorio, por estar presentes durante la realización de los experimentos, enseñando y compartiendo experiencias.

A mis amigos del doctorado que durante todo este tiempo me han apoyado y siempre estuvieron conmigo, a Ezequiel, Cris, Patri, Ana, Nelson, Mónica, Raúl, Wendy Paloma, Virginia, Hussein. A mis amigos del Ateneo: Raúl, Elaine, Ricardo, Merce y Nati por su grata compañía y su feliz acogida en este país.

A mis amigos colombianos, compañeros de la vida: Jaime, Lulo, Hugo, Garibelo, Oscar, Paula, Mase, Mónica, Angélica, el Doctor Cadena, la Profa. Carmen, por soportarme tantas parrandas y años de divagar y filosofar sobre la vida, la biología y la política y por su sincera amistad.

A mis hermanos Ernesto, Diana y Carolina, a mis tíos Oscar, Alberto, Hernando y primos Bertele, Juan Diego, Luciano, Alejandra y María: A Victoria, Cristina, Estela y Camilo, a todos ellos, no sé cómo expresar el enorme cariño que les tengo. Sin su apoyo y confianza nunca habría podido llegar hasta el feliz término de este trabajo y seguir aventurándome en nuevas experiencias

A mi abuelos Bertha, Hernado, Luis, Blanca y a mis padres Gladis y Ernesto sólo decirles que todo se los debo, que lo que soy es el reflejo de su amor y dedicación para con toda la familia, gracias por su cariño.

Índice

ÍNDICE

I. Introducción. 1

1. Antecedentes.	3
2. Antecedentes históricos de la Epilepsia.	4
3. Visión actual de la epilepsia: La emergencia de las crisis epilépticas y la organización del SNC.	7
4. Los receptores opioides: implicación en la emergencia de las crisis epilépticas.	12
5. Un receptor cercano a la familia de los receptores opioides, el receptor ORL1 (<i>opioid receptor like</i>) implicado en las crisis epilépticas.	16
5.1 Identificación del receptor ORL1 y su ligando endógeno Nociceptina.	16
5.2. Distribución de la expresión del receptor ORL1.	18
5.3 Receptor opioide ORL1 implicado en el desarrollo de cuadros epilépticos.	19
5.4. La compleja función del sistema ORL1 y su papel en la modulación de múltiples comportamientos asociados a regiones cerebrales alteradas en los cuadros epilépticos	21
6. Modelo animal de epilepsia utilizado en el estudio.	24
6.1 Modelos animales de crisis epilépticas producidas por estimulación auditiva.	25
6.1.1 Los circuitos implicados en la emergencia de las CCA (bases anatómicas).	28
6.1.2. Los hámsters GASH/Sal un nuevo modelo de CCA, utilizado en el estudio.	31

II. Hipótesis y Objetivos. 35

37

III. Metodología. 39

1. Diseño experimental	41
2. Animales de experimentación	42
3. Metodología	42
3.1 Prueba de susceptibilidad audiógena (PSA)	42
3.2 Caracterización molecular del receptor opioide en el hámster dorado (<i>Mesocricetus auratus</i>)	43
3.2.1 Extracción de RNA total	43
3.2.2 RT-PCR	44
3.2.3 Purificación de los fragmentos amplificados por PCR.	45

3.2.4 Secuenciación automática de DNA	46
3.2.5 Análisis de las secuencias	46
3.3. Análisis histológicos	47
3.3.1. Obtención del material biológico	47
3.3.2. Técnicas de tinción inmunohistoquímicas	47
3.3.3. a) Preparación del tejido para la observación al microscopio óptico	48
b) Preparación del tejido para la observación al microscopio confocal	49
4. Análisis de las secciones histológicas	50
4.1 Obtención y procesamiento de las imágenes de microscopía óptica	50
4.2 Obtención y procesamiento de las imágenes de microscopía confocal	51

VI. Resultados. 53

1. Caracterización molecular del receptor opioide en el hámster dorado (<i>Mesocricetus auratus</i>)	55
2. Comparativa y análisis filogenético del receptor ORL1 de hámster.	60
3. Expresión histoquímica postcrisis en la región troncoencefálica del cerebro de los hámsters GASH:Sal de la proteína Fos y ORL1	64

V. Discusión. 79

1. Caracterización molecular del receptor ORL1 en el hámster dorado (<i>Mesocricetus auratus</i>).	81
2. Inmunorreactividad de la proteína Fos.	85
3. Inmunorreactividad de ORL1 en el CI.	89
4. Implicación del receptor ORL1 en la epilepsia	90

VI. Conclusiones. 95

97

VII. Bibliografía. 99

101

VII. Anexos. 131

Abreviaturas

Abreviaturas

ABC	Complejo avidina biotina
AMG	Amígdala
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BCC	Biculina
CCA	crisis convulsivas audiogénicas
CCI	Comisura del Colículo inferior
CCI	Corteza del colículo inferior
CDCI	Corteza dorsal del Colículo inferior
CDCI	corteza dorsal del colículo inferior
cDNA	Ácido desoxirribonucleico o ADN complementario
CECI	Corteza externa del Colículo inferior
CECI	Corteza externa del colículo inferior
CGM	Cuerpo geniculado medial
CI	Colículo inferior
COS	Complejo olivar superior
CPCS	Capa profunda del colículo superior
CS	Colículo superior
Cy2	Cianidina 2
Cy5	Cianidina 5
CxDCl	Corteza dorsal del colículo inferior
CxECl	Corteza externa del colículo inferior
CxP	Corteza perirrinal
d.C.	después de Cristo
DAB	3-3' diaminobencidina
dB	Decibelio
DBA	Terahydrochoride amina dextrano biotinado
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EEG	Actividad encefalográfica
EMBL	European Bioinformatics Institute
FELASA	Federación Europea de animales de laboratorio
FPR	Formación reticular pontina
GABA	Ácido γ amino butírico
GASH:Sal	Genetic audiogenic seizures hamster Salamanca
GEPR	Genetically epilepsy-prone rat
GPG/Vall	Genetically epilepsy-prone hamster Valladolid
Hz	hercio
i.c.v.	Intra-cerebro-ventricular
i.p.	Intraperitoneal
J-113397	-(3R,4R)-1-cyclooctylmethyl-3-hydroxymethyl-4-piperidinyl]-3-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one
K.O.	Knock out
LE	Rata Long-Evans
LVG (SIR)	Hámster sirio dorado Lakeview
maORL	opioide like del hámster analizado
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NC	Nociceptina
NCBI	National Center for biotechnology information
NCCI	núcleo central del colículo inferior
NCn	Núcleo cuneiforme

NDLL	Núcleo dorsal del lemnisco lateral
NLL	Núcleo del lemnisco lateral
NMDA	ácido N-metil-D-aspartato
NVLL	Núcleo ventral del lemnisco lateral
OFQ/N	Orfanina FQ/ nociceptina
ORL1	Opioid Receptor Like 1
PCR	Polymerase chain reaction
Pn	Núcleo del puente
PnO	Núcleo reticular oral del puente
PRF	Formación reticular pontina
PSA	Prueba de susceptibilidad audiogénica
PsTC	Tónico-clozónico post-ictal
PTZ	Pentilenetrazona
rRNA	ARN ribosómico
RT-PCR	Retrotranscriptasa – reacción en cadena de la polimerasa.
s.d.	Sin determinar
SD	Rata Sprague-Dawley
SFK 10.047	2`hidroxi-5,9-dimetil-2alil-6,7-benzomorfanó
SGP	sustancia gris periacueductal
SNC	Sistema Nervioso Central
SNR	Sustancia negra reticulada
TBE	Tris/Borate/EDTA
TBS	Tris salino tamponado
TF	Tampón fosfato
WAR	Rata Wistar audiogénica

Introducción

1. Antecedentes.

Una actividad excitatoria anormal o excepcional del Sistema Nervioso Central (SNC) puede desencadenar en los individuos comportamientos a su vez anómalos e involuntarios que llegan a degenerar, en algunos casos, en episodios convulsivos graves. Cuando estas crisis del SNC son recurrentes o crónicas pueden encuadrarse dentro de los síndromes epilépticos.

Las múltiples causas que pueden desencadenar las crisis epilépticas y las distintas expresiones comportamentales (con sus diferentes grados de intensidad) que se manifiestan en los individuos de diversas especies, hacen de la epilepsia un buen modelo para el estudio de la organización compleja del sistema nervioso central (SNC).

El sentido de este trabajo es aportar información sobre el receptor ORL1 (*opioid receptor-like 1*), con características estructurales opioides, en el esclarecimiento de las funciones organizativas del SNC, de un modelo animal que presenta convulsiones audiógenas, el hámster GASH:Sal.

En las páginas siguientes expondremos los datos más relevantes encontrados en la bibliografía sobre la epilepsia y las crisis epilépticas, haciendo énfasis en un tipo especial de epilepsias denominadas epilepsias reflejas o crisis inducidas por estímulos sensoriales. En este sentido, fue utilizado el modelo animal de crisis convulsivas que se desencadenan por estímulos auditivos. Revisaremos el concepto de receptor opioide y la historia física y funcional particular del receptor opioide ORL1, desde su clonación hasta los estudios que lo relacionan con las crisis epilépticas. Además, abordaremos otros aspectos que consideramos claves para la comprensión de nuestro trabajo como son los aspectos sistémicos-organizativos y comportamentales de los animales con crisis convulsivas.

Desarrollaremos esta idea haciendo una doble mirada: los estados organizativos del sistema que afectan a la expresión y función de ORL1 y a su vez cómo el modelo receptor ORL1 / ligandos afecta a la organización misma del sistema.

2. Antecedentes históricos de la Epilepsia.

En la antigua Babilonia (2000 años a.c) se encuentra el primer registro histórico que hace referencia a la epilepsia. En el “Sakikku” o libro de todas las enfermedades, tallado sobre tablas de piedra, se habla de una condición denominada *antashube* que coincide con un diagnóstico muy aproximado al actual de epilepsia (Wilson-Kinnier y Reynolds, 1990).

Por lo que conocemos de la información recolectada de muchas y variadas culturas ancestrales hasta nuestros días, observamos que frecuentemente la epilepsia aparece con un aire de misterio, una enfermedad de difícil comprensión. Así, en culturas antiguas de China, Japón y Egipto se consideraba que las personas que tenían estos ataques eran seres misteriosos. Por otra parte, en África, bien un espíritu ancestral se apoderaba del individuo o éste estaba bajo el influjo de la luna y entre los indios navajos de Norteamérica se atribuían las crisis epilépticas a relaciones incestuosas.



Figura1: “nesejet” enfermedad enviada por Dios sumamente peligrosa. Ant Egipcios.

El mismo término epilepsia, procede del griego “*epilhyia*”, que significa “ser agarrado”, “atacado” o “atrapado”. Estos calificativos nos dicen mucho de lo paradójico de la enfermedad, de la pérdida de control del individuo sin causa aparente o como si éste estuviera gobernado por otro ser. Para los griegos, la epilepsia era la “enfermedad de Hércules” y su origen era divino, puesto que

sólo los dioses podían arrojar una persona al suelo, privarla de sus sentidos, convulsionarla y traerla de nuevo a la vida aparentemente sin ninguna repercusión (Muñoz 2004).

Sin embargo, en algunas culturas se trató la epilepsia como una enfermedad que aunque de origen divino o natural, podía prevenirse y curarse. Los incas y especialmente los aztecas, usaban para el tratamiento de la enfermedad un gran número de medicinas botánicas y preparaban diversos remedios a partir de elementos naturales (Elferink, 1999). Se utilizaban plantas como el alhelí y la pimpinela, y sangre y carne de animales como el cóndor, la llama, la golondrina, el zorzal, el puma y el perro. También se usaba un polvillo obtenido a partir del raspado de determinadas piedras (Cruz-Campos 1998).

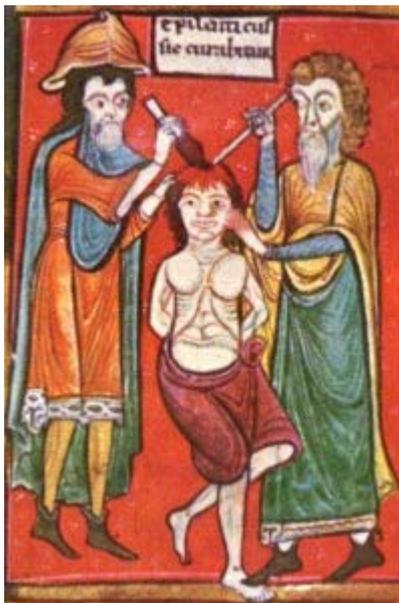


Figura2: *Epilepticus curabitur*
Manuscrito Sloane, manual médico
compilatorio. Finales del s. XII.
Museo británico, Londres.

En su artículo: “Historia de la epilepsia en la medicina iraní medieval” Gorji, (2001) menciona las recomendaciones generales referidas por dos de los médicos más brillantes de su tiempo: Rhazes (860-940 s.d) y Avicena (980-1037 s.d), quienes aconsejaban evitar la natación, el calor fatigante, mirar objetos brillantes incluyendo el sol y la luna y evadir las emociones fuertes. Eran recomendados los masajes con aceite de sésamo, castor y narciso desde la zona del pecho hasta los órganos bajos. Además, consideraban de gran importancia la comida y la dieta. La terapia dietética jugaba un papel fundamental en el manejo de los epilépticos, ejemplo de ello lo constituía la abstinencia de zanahoria, cebollas, productos derivados de la leche, frutas secas, pescado y vino.

Fue desde Hipócrates cuando se empezó a considerar que la epilepsia tenía su origen en el cerebro y la “enfermedad sagrada” ya pudo encontrar su nacimiento

encarnado en la cultura occidental. Durante más de un milenio se consideró la existencia de tres formas distintas de epilepsia según su origen: la epilepsia debida a una enfermedad idiopática, la debida a una afección simpática del cerebro y originada en el cardias y la debida a una afección simpática pero originada en cualquier otra parte del cuerpo. Esta clasificación fue hecha por Galeno en el siglo II d.C.

Ya en el siglo XIX se empiezan a utilizar los términos “*grand mal*” y “*petit mal*” para diferenciar los tipos de crisis epilépticas y Calmeil introduce el término “ausencia” como una variante del “*petit mal*”, así como el “*état de mal*” (*status epilepticus*) para los ataques o convulsiones repetidas sin una completa recuperación de la conciencia entre cada episodio convulsivo. El neurólogo inglés John Hughlings Jackson (1835-1911) trabajó muchos años con pacientes epilépticos y en sus numerosos artículos logró relacionar de forma muy clara el papel del sistema nervioso en las crisis epilépticas. Jackson sostenía que las epilepsias se producían más por excitación que por supresión de la función cerebral (Temkin, 1971) y escribió además que “*la convulsión no es apenas un síntoma, implica una descarga del tejido nervioso sobre el músculo*” (Covo, 2006). Después de los trabajos de Fritsch y Hitzig en perros y de David Ferrier en monos (1870), en los que se mostraba que la estimulación de la corteza producía convulsiones, Jackson era escéptico al respecto, cambió su posición y afirmó que “*epilepsia es el nombre para una descarga local ocasional, súbita e intensa de la materia gris*” (Covo, 2006), noción de la epilepsia que se mantiene vigente. Sir William Gowers realizó estudios sobre la epilepsia durante el sueño y la vigilia, (el sueño era considerado por Hipócrates como otro tipo de crisis cerebral) y a finales del siglo XIX propuso una clasificación de los tipos de epilepsia diferenciándolos entre idiopáticas y sintomáticas, tomada actualmente como base de las clasificaciones de la enfermedad.

En el ámbito clínico, la primera intervención quirúrgica realizada con éxito en un paciente con epilepsia postraumática fue llevada a cabo por Victor Horsley en 1886. También en la segunda mitad de este siglo se detallaron los efectos sedantes de las sales inorgánicas de bromuros. En este sentido, Sir Charles Locock utilizó en 1857 el bromuro de potasio para el tratamiento de las crisis catameliars e informó de la

existencia de una disminución considerable en la frecuencia de las crisis (Locock C, 1857), resultados que permitieron el comienzo en firme de las terapias farmacológicas para el tratamiento de la epilepsia. El mayor problema de los bromuros era su elevada toxicidad y la común aparición de síntomas psicóticos tras exposiciones prolongadas. En 1875, Voisin describió una intoxicación dosis-dependiente con psicosis y signos neurológicos (Lund M, 1997). Los bromuros fueron entonces reemplazados a principios del siglo XX por los barbitúricos.

Uno de los grandes aportes para la comprensión del fenómeno de la epilepsia fue el descubrimiento del encefalograma para el estudio de la actividad eléctrica del cerebro. Hans Berger, interesado en la relación entre los procesos mentales y los procesos materiales del cerebro, obtiene en 1924 el primer registro de las oscilaciones rítmicas del cerebro en un joven de 17 años, a través del orificio de una trepanación descompresiva utilizando un galvanómetro de cuerda (Palacios, 2000). Unos años después, en 1931, Berger se refirió a la frecuencia con la que se observa actividad electroencefalográfica (EEG) anormal en pacientes con epilepsia y registró por primera vez actividad punta-onda. En 1935 los doctores Gibbs, Davis y Lennox demostraron la presencia de complejos de punta onda interictal y Lennox y Gibbs en 1936, registran cargas anormales focales durante las crisis de ausencia (Palacios, 2000).

3. Visión actual de la epilepsia: La emergencia de las crisis epilépticas y la organización del SNC.

Para poder comprender cómo funciona este complejo sistema de interacciones de los sistemas vivos que desarrollan la epilepsia, los modelos experimentales de esta enfermedad se dirigen en especial al estudio de diferentes aspectos: en primer lugar aquéllos que producen la actividad interictal, en segundo lugar los mecanismos que inician la crisis (ya sea a partir de una punta EEG interictal o sobre un fondo de actividad normal), otro aspecto a considerar son los mecanismos por los cuales la actividad epiléptica se distribuye bien localmente o bien a todo el cerebro llegando a

una actividad neuronal sincronizada. Por último, el mecanismo por el cual se producen focos secundarios (Contreras, 2000).

En general, se considera que la evolución de un proceso epileptiforme se debe a la alteración del delicado balance entre excitación e inhibición neuronales en dos planos, la red nerviosa y la célula, causando un aumento en la excitabilidad (Uhlhaas y Singer (2006).

Las interacciones de excitación e inhibición para mantener el equilibrio del sistema a nivel celular ocurren por medio de las corrientes de membrana de calcio y sodio voltaje-dependientes, cuyo fin es potenciar entradas sinápticas excitadoras de baja amplitud que despolaricen la membrana autorregulados por corrientes de potasio y calcio voltaje-dependientes que controlan el potencial de membrana e impiden que la célula se despolarice de forma anormal (Linás, 1988). Así, el bloqueo de las corrientes de potasio en modelos experimentales de epilepsia produce aumento de la excitabilidad neuronal que conduce a crisis epilépticas (Contreras, 2000).

En la bibliografía referente a los circuitos neuronales locales se describe que la alta densidad de conexiones excitadoras recíprocas está regulada por interneuronas inhibitoras de proyección local (axón corto) que utilizan el ácido gamma-aminobutírico (GABA) como neurotransmisor inhibitor. Los circuitos neuronales están organizados de tal manera que las entradas y salidas excitadoras de una neurona dejan colaterales en interneuronas inhibitoras locales de forma que se genera un circuito de inhibición anterógrado y de retroalimentación respectivamente que limita localmente la cantidad de excitación. Este diseño permite que los circuitos se autorregulen, es decir, el aumento o disminución de la excitación ocasiona el aumento o la disminución de la inhibición (Contreras, 2000).

Las interneuronas GABAérgicas juegan un papel crítico en el mantenimiento de la pérdida de balance entre la excitación e inhibición de los circuitos neuronales (Levitt

2005) y en consecuencia los ataques convulsivos pueden ser suprimidos o reducidos por un aumento de la transmisión GABAérgica (Snead, 1992). En modelos experimentales de ausencia, se ha observado que agonistas de receptores GABA_B incrementan la actividad de disparo, mientras que el bloqueo de estos receptores reduce el número de los mismos (Marrosu y cols., 2006).

Asimismo existen otros mecanismos locales de la red que pueden influir en la generación y amplificación de un proceso epileptogénico como: el aumento de la transmisión glutamatérgica en la vía perforante en células granulares dentadas mediado por un aumento de los receptores NMDA, que fomentan la generación de convulsiones y epileptogénesis producto de una alteración de la función hipocampal (Scimemi y cols., 2006). La inhibición de receptores NMDA a su vez, puede inhibir procesos epileptogénicos en modelos de post-estatus epilépticos (Prasad y cols., 2002; Rice y DeLorenzo, 1998).

Es importante agregar que es posible que los procesos epileptogénicos sólo se puedan desencadenar por la adición de fallos en más de una mecanismo que regula la excitabilidad neuronal. Sugieren Khalilov y cols. (2005) que sólo se pueden desencadenar procesos epileptogénicos en estados inmaduros del hipocampo, por la acción sinérgica entre estados anormales en la transmisión GABAérgica y la transmisión glutamatérgica mediada por receptores NMDA.

También se conoce que el acoplamiento eléctrico entre las neuronas a través de las uniones comunicantes (*gap junctions*) puede jugar un importante papel en la propagación de la actividad epiléptica (Carlen y cols., 2000; Dudek y cols., 1999) pudiendo ser un elemento clave en el desencadenamiento de las convulsiones (Traub y cols., 2001; Gigout y cols., 2006).

Ahora bien, si observamos el funcionamiento global del sistema nervioso, vemos que la sincronización entre el sistema sensorial y motor no solamente depende

de la sincronía entre las interacciones locales de neuronas excitatorias e inhibitorias, sino de grandes conjuntos neuronales que constantemente desaparecen y surgen a través de interacciones cooperativas en las que cada neurona tiene múltiples y cambiantes grados de respuesta a estímulos dependiendo del contexto en que se encuentre el sistema (Freeman, 1993; Varela y cols, 2001).

Según la teoría de la *emergencia*, el sistema nervioso central podríamos considerarlo como un conjunto de componentes simples (no cognitivos) que se conectan unos con otros de forma densa. Cada componente opera solamente en su entorno *local*, pero debido a la estructura de red del sistema nervioso completo, existe una cooperación global que *emerge* espontáneamente cuando los estados de todos los componentes participantes alcanzan un estado mutuamente satisfactorio sin necesidad de una unidad de procesamiento central que guíe la operación completa. Es el paso desde las normas locales a una coherencia global, donde las propiedades de la coherencia del sistema no son dadas por las propiedades individuales sino por el sistema completo y en el que, sin embargo, cada componente contribuye a su emergencia y características (Varela y cols, 2001).

El estudio de Freeman (1986) con registros EEG sobre epilepsias de características de "*petit mal*" en el bulbo olfativo demuestra que la expresión de una convulsión no es la simple suma de potenciales neuronales que conducen a disparos sincronizados anormales, sino que es la expresión de fallos en el complejo sistema de control de retroalimentación (*feedback*) del sistema. Por otra parte, manifiesta que la actividad motora estereotipada es debida a la interrupción del flujo normal del comportamiento dirigido a lograr una meta y no es el simple resultado de descargas neuronales repetitivas en el sistema olfativo. Así, concluye el autor, que la aparición de estados convulsivos es una propiedad emergente de la interacción de mutua excitación e inhibición entre el bulbo olfativo, el núcleo anterior olfativo y la corteza prepiriforme debido a la asimetría inducida en la retroalimentación de la red que controla la actividad normal de este sistema en concreto y que puede propagarse a regiones altamente conectadas a este sistema como el cerebro anterior y el sistema límbico.

Se sugiere que la *hiperexcitabilidad eléctrica* que se genera en la actividad epileptiforme, incluso en supuestas epilepsias focales, es una propiedad de la distribución de la red nerviosa en su totalidad, más que de unas pocas neuronas en un punto específico de la red (Faingold, 2004). Este concepto está basado en: estudios *in vitro* en modelos animales de epilepsia en el lóbulo temporal, estudios intracraneales con EEG y neuroimágenes en humanos y por último, en personas con tratamientos efectivos contra la epilepsia (Bertram y cols., 2001; Norden y Blumenfeld, 2002; Spencer, 2002; Avolí y cols., 2002; Gulyas-Kovacs y cols., 2002).

En la actualidad se considera que la transitoria sincronía de las descargas neuronales es el posible mecanismo por el cual se integran las recíprocas interacciones entre grandes poblaciones neuronales, extensamente distribuidas a través de las distintas regiones especializadas del cerebro (Abeles, 1991; Bruno y Sakman, 2006), produciendo la emergencia de un coherente ensamblaje que observamos como el flujo adaptativo y unificado de cada momento cognitivo (Singer., 1999, Varela y cols., 2001; Fries, 2005).

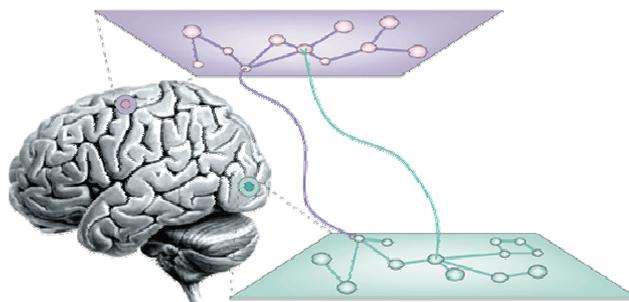


Figura 3: Representación esquemática de la asociación transitoria de una red neuronal en interacciones dinámicas a larga escala en el SNC (Varela y cols, 2001).

Le Van Quyen y cols. (2003), observaron que en pacientes con epilepsia focal neocortical, el 77% de las crisis epilépticas estaban acompañadas de una reducción preictal en la sincronía entre los diferentes registros cercanos al foco epileptogénico. Dumas de la Roque y cols. (2005) también describen que en pacientes con epilepsia parcial no tratable, la conectividad se reduce entre las regiones corticales adyacentes al foco generador, aumentando la pérdida de conectividad cuanto más distante sea la región cortical registrada. Lo que nos indica según Uhlhaas y Singer (2006) que la actividad convulsiva en las crisis epilépticas puede estar correlacionada con un incremento en la sincronía local de la red, a la vez que una reducción en la sincronía a larga escala. Es interesante subrayar además, que la finalización de un estado convulsivo puede estar fomentada por un incremento de la sincronización de la actividad neuronal que emerge como un mecanismo de autorregulación de la red (Schindler y cols. ,2007).

En conclusión, los estados epilépticos no son sólo la consecuencia del aumento de la excitabilidad neuronal como resultado de la pérdida de balance entre mecanismos excitatorios e inhibitorios, sino que también repercute la alteración de los mecanismos que soportan los patrones de oscilación y sincronización de la actividad neuronal en el estado normal de las funciones cerebrales (Uhlhaas y Singer, 2006).

4. Los receptores opioides: implicación en la emergencia de las crisis epilépticas.

En el año 1973 se demostró la existencia de sitios de unión específicos, estereoselectivos y saturables para unas sustancias denominadas opioides en el sistema nervioso central de mamíferos (Pert y Snyder, 1973; Simon y cols., 1973; Terenius, 1973). Estos sitios de unión no presentaban una distribución homogénea dentro del sistema nervioso, siendo más abundante su localización en amígdala, sustancia gris periacueductal, hipotálamo, tálamo y núcleo caudado (Kuhar y cols., 1973).

Inicialmente se definieron tres tipos de receptores opioides en función de la existencia de un compuesto selectivo: μ por morfina; κ , por ketociclazocina y σ por SKF10.047, si bien este último no se considera hoy en día como un receptor opioide, en parte debido a que su actividad no es bloqueada por el antagonista naloxona como ocurre con los demás receptores opioides. Un tercer tipo de receptor opioide, que se denominó δ se descubrió al analizar la acción del péptido endógeno encefalina en el vaso deferente del ratón, donde, al contrario de lo que ocurría en el *ileum*, poseían una actividad mayor que la morfina (Lord y cols., 1977). El receptor δ fue clonado por primera vez por Evans y cols., (1992) en ratón, el receptor μ por Fukuda y cols., (1993) en rata y el receptor κ por Yasuda y cols., (1993) en ratón y Nishi y cols., (1993) en rata.

Desde el siglo XIX se describen propiedades proconvulsivas y anticonvulsivas del opio en informes clínicos y experimentales (Krueger y cols, 1941; citado en Tortella, 1988). Estos 150 años de relación paradójica entre los opioides y las persistentes crisis convulsivas, han animado, desde la década de los 70, a realizar estudios tendentes a determinar el posible papel de los péptidos opioides en la epilepsia (Tortella, 1988).

Estudios con morfina (un derivado del opio) a distintas dosis han mostrado tener efectos tanto convulsivos como efectos anticonvulsivos en ratas (Urca y Frenk, 1980), ratones (Manssur y col., 1981) y en especial en ratones susceptibles a epilepsias audiogénicas, la morfina reduce la incidencia y prolongación de la latencia de las crisis, efecto revertido con naloxona (Chen y Gates, 1976). Otros fármacos como el U-554494A, poseen propiedades anticonvulsivas como agonista de receptores κ (Von Voigtlander y cols., 1987). En humanos con epilepsia del lóbulo temporal se ha demostrado la relación entre el incremento en la expresión de receptores opioides y las fases finales de crisis convulsivas espontáneas (Hammers y cols., 2007).

Este fenómeno paradójico puede deberse al complejo balance entre los receptores y péptidos endógenos opioides en la emergencia de la red neural implicada en la generación y extensión de las crisis epilépticas en las distintas regiones cerebrales.

Madar y cols., (1997), registran en epilepsias unilaterales del lóbulo temporal un aumento diferencial de la expresión de los receptores δ y μ en las regiones implicadas en la crisis epiléptica, siendo el aumento de la expresión del receptor μ restringido a regiones adyacentes al foco epiléptico, mientras los receptores δ se incrementan en forma mas extendida en corteza temporal inferior y en otras regiones corticales superiores. Los autores sugieren un posible mecanismo de regulación de los receptores opioides en la crisis epiléptica, donde los receptores μ están relacionados en la supresión de la llegada de descargas convulsivas originadas desde estructuras subcorticales como amígdala e hipocampo, mientras receptores δ pueden estar relacionados con la regulación de la proliferación intracortical de actividad convulsiva, mostrando una funcional especialización de los receptores en el desarrollo de las crisis.

Pero según Simmons y Chavkin, (1996), los péptidos opioides endógenos (como la encefalina y la dinorfina) pueden tener una función contraria en algunas regiones cerebrales en las crisis epilépticas, como en las epilepsias generadas en el hipocampo donde los receptores μ tiene una función proconvulsiva, mientras los receptores κ median en procesos anticonvulsivos (Pan, 1998).

Otros estudios confirman que puede existir un papel modulador de los receptores μ en la generación de actividad epileptiforme en distintas regiones cerebrales. En epilepsias del lóbulo temporal se producen potenciales epileptiformes sincrónicos entre la corteza perihinal e insular, producida por la red neural GABAérgica y modulada por la actividad de los receptores μ (Sudbury y Avioli, 2007).

Esto también se puede observar en las crisis epileptogénicas producidas en animales susceptibles a sufrir convulsiones por estimulación con ruidos fuertes (ratas GEPR-9s) en donde, el bloqueo de los receptores opioides con microinyecciones del antagonista naloxona en la región gris periacueductal (una de las regiones críticas en el desencadenamiento de convulsiones en este tipo de modelos epilépticos), produce la supresión de la susceptibilidad a presentar crisis convulsivas (N'Gouemo y Faingold, 1999), posiblemente por la influencia de receptores μ en la liberación de GABA en subpoblaciones de neuronas GABAérgicas en el colículo inferior (Tongjaroenbungam y col., 2004). También se ha observado una mayor expresión de péptidos opioides en la formación hipocampal en ratas GEPR-9s susceptibles a convulsiones audiogénicas (Savage y cols., 1988).

A su vez, las encefalinas están altamente correlacionadas en la mayor parte de los circuitos neuronales que expresan la proteína *Fos* (con alta expresión en crisis convulsivas) en convulsiones inducidas por ácido kaínico, especialmente en las regiones afectadas en este tipo de crisis como: núcleo anterior, cuerpo estriado, complejo amigdaloides, giro dentado, hipocampo e hipotálamo, área lateral y anterior (Pretil y cols., 1995).

En cambio, en los modelos experimentales de epilepsia se ha observado que la distribución y regulación del neuropéptido dinorfina es consistente con la función endógena anticonvulsiva (Kanamatsu y cols., 1986; Tordella, 1988; Gall y cols., 1990; Douglass y cols., 1991; Hong, 1992; Romualdi y cols., 1995; Simonato y Romualdi, 1996; Pierce y cols., 1999) y la baja expresión de dinorfina en humanos se ha asociado con la vulnerabilidad a padecer epilepsia (Stogmann y cols., 2002; Gambardella y cols., 2003), como también se observa en estudios con ratones KO de prodinorfina, en donde se muestra el importante papel anticonvulsivo de los receptores κ y la dinorfina en la regulación de la excitabilidad hipocampal (Loacker y cols., 2007).

En modelos animales con convulsiones producidas por infección de *herpes simplex 1*, las convulsiones pueden ser bloqueadas por agonistas selectivos para el

receptor κ y la disminución en hipocampo de la expresión de dinorfina se correlaciona con la propensión a sufrir crisis convulsivas (mediado por receptores κ), con un incremento a su vez, de la expresión de encefalinas en hipocampo (Solbrig y cols., 2006).

Como hemos podido observar existe un relevante papel de los receptores opioides en la regulación de las crisis epilépticas, asociado al balance entre receptores y dependiendo de la red neuronal que emerge durante el desarrollo de las crisis. A continuación haremos hincapié en un nuevo receptor tipo opioide con características funcionales especiales, que afecta a múltiples estados del comportamiento y recientemente ha sido relacionado como regulador clave en las crisis epilépticas, jugando un importante papel en la coherencia de las redes neuronales implicadas en este tipo de alteraciones cerebrales.

5. Un receptor cercano a la familia de los receptores opioides, el receptor ORL1 (*opioid receptor like*) implicado en las crisis epilépticas.

5.1 Identificación del receptor ORL1 y su ligando endógeno Nociceptina.

En la búsqueda de subtipos de los receptores opioides clásicos μ , δ ó κ , por medio de sondas compuestas por oligonucleótidos, deducidas de secuencias de cDNA de estos receptores opioides y utilizando condiciones de bajo rigor en escrutinios de genotecas de cDNA, se produjo la clonación de un nuevo receptor en varios laboratorios y en varias especies. En rata, se denominó Hyp 8-1 (Wick y cols.,1994), oprl (Chen y cols.,1994), C3 (Lachowicz y cols.,1995), XOR1 (Wang y cols.,1994), LC132 (Bunzow y cols.,1994) y ROR-C (Fukuda y cols.,1994); en ratón MOR-C (Nishi y cols.,1994) y KOR3 (Pan y cols.,1996a); y en humanos ORL1 (Mollereau y cols.,1994). Con los años, se ha adoptado la terminología de ORL1, acrónimo del inglés *opioid receptor like*, para denominarlo.

Este receptor presentaba una alta homología con los receptores opioides clonados hasta el momento, exhibiendo la proteína una identidad del 67% con los receptores opioides (Bunzow y cols.,1994; Mollereau y cols.,1994). Dada la alta homología que presentaba este nuevo receptor con los miembros de la familia opioide se le consideró como un miembro más, pero al realizar los estudios farmacológicos se pudo comprobar que ORL1 no unía con gran afinidad ningún ligando opioide tanto agonista como antagonista.

Las propiedades particulares del receptor ORL1 condujeron a la identificación, en dos laboratorios distintos e independientemente, de un péptido endógeno denominado nociceptina (Meunier y cols.,1995) u orfanina FQ (Reinscheid y col., 1995). Asumiendo que el receptor podría unir un ligando peptídico y que podría acoplarse al mismo sistema de segundos mensajeros que los receptores opioides, se utilizaron extractos de proteínas de cerebro de rata o cerebro de cerdo y, atendiendo a su capacidad para inhibir la acumulación de AMPc estimulada por forskolina, se obtuvo una fracción que al ser secuenciada resultó ser una cadena de 17 aminoácidos que exhibía una gran homología con los péptidos opioides, en particular con la Dinorfina A, pues presenta el mismo número de restos aminoacídicos (17). El extremo N-terminal del péptido es muy similar a la secuencia canónica de los péptidos opioides, difiriendo solamente en el primer aminoácido en el que la tirosina presente en los péptidos opioides cambia por fenilalanina (Figura 4).

Noc/Orp FQ	<u>F</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> TGARKSARK <u>L</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>Q</u>
Dinorfina A 1-17	Y <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> LRRIRPKL <u>K</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>Q</u>
Secuencia canónica	YGGF

Figura 4: Comparación de las secuencias aminoacídicas de la Nociceptina u Orfanina FQ y la Dinorfina A. Se muestran subrayados los aminoácidos idénticos entre estos dos péptidos.

Ensayos posteriores con este nuevo péptido mostraron que la inhibición de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina no variaba con la presencia de

agonistas o antagonistas opioides. Por otra parte, ensayos de unión al receptor ORL1 con el péptido marcado radiactivamente confirmaron que la unión al receptor se producía de forma específica, saturable y con alta afinidad. Dadas las semejanzas entre la Nociceptina u Orfanina FQ (OFQ/N) y los péptidos opioides, se ha sugerido una posible relación evolutiva entre ellos pero una divergencia farmacológica (Reinscheid y cols., 1995).

5.2. Distribución de la expresión del receptor ORL1.

Todos los estudios de expresión del receptor ORL1 realizados hasta el momento muestran una buena correlación entre los datos obtenidos de la unión de nociceptina marcada y los observados en experimentos de hibridación *in situ* (Bunzow y cols., 1994, Fukuda y cols., 1994, Mollereau y cols., 1994, Wick y cols., 1994, Lachowicz y cols., 1995, Nothacker y cols., 1996; Neal y cols., 1999a; Lethworth y cols., 2000, O'Donnell y cols., 2001 y Clarke y cols., 2001).

Al igual que en el caso del receptor ORL1, la expresión del ligando endógeno, la nociceptina (NC), también ha sido bien descrita por varios autores (Dickenson 1996; Riedl y cols., 1996; Kummer y Fischer, 1997; Mitsuma y cols., 1998; Neal y cols., 1999b; Houtani y cols., 2000; O'Donnell y cols., 2001). La localización de la nociceptina se corresponde con la que presenta su receptor tanto en experimentos de inmunorreactividad como con niveles de mRNA detectados por hibridación *in situ*. Se ha encontrado expresión de nociceptina en septum lateral, hipotálamo, parte ventral del diencéfalo, claustrum, cuerpos mamilares, amígdala, hipocampo, tálamo, habénula medial, tegmentum ventral, sustancia nigra, gris central, núcleos interpedunculares, nucleus ambiguus núcleo espinal caudal de trigémino y formación reticular, además de las astas dorsal y ventral de la médula espinal, cuerpo trapezoide, núcleo paraolivar superior, núcleo medioventral periolivar, células aisladas en la región dorsal, lateroventral y superior del núcleo periolivar y en la oliva lateral superior. Asimismo, Kho y col., 2006 detecta por inmunorreactividad a nociceptina en regiones cocleares

como las fibras eferentes que cruzan el túnel de Corti y en la región basal tanto de las células ciliadas internas como externas.

Por otra parte, usando ensayos de RT-PCR Wang y colaboradores (1994) mostraron la presencia del mRNA del receptor en intestino, músculo esquelético, vaso deferente y bazo de rata. También se ha encontrado en subpoblaciones de linfocitos (Halford y cols., 1995 y Wick y cols., 1995).

5.3 Receptor opioide ORL1 implicado en el desarrollo de cuadros epilépticos.

Evidencias circunstanciales permitieron pensar que el sistema ORL1-NC podría estar implicado en procesos epilépticos o convulsivos como: en primer lugar, la expresión del receptor ORL1 en áreas del cerebro anterior (células granulares del hipocampo) implicadas en convulsiones límbicas (Mollereau y cols., 1994; Nothacker y cols., 1996), por otra parte, en la inhibición excitatoria de la transmisión sináptica y de potenciación a largo plazo por NC a través de mecanismos postsinápticos (Yu y Xie, 1998), asimismo, se ha observado la inhibición por parte de NC de corrientes de canales Ca^{2+} tipo T y el bloqueo a su vez de NC, de las descargas en ráfaga que producen estos canales, pudiendo contribuir a procesos convulsivos en las neuronas centrales del ganglio de la raíz dorsal (Abdulla y cols., 1997).

En experimentos *in vitro*, NC potencia la inhibición anterógrada hipocampal en células piramidales CA1 y a su vez, a bajas concentraciones de NC reduce la frecuencia de disparo de impulsos epileptiformes inter-ictales en neuronas CA3 hipocampales (Tallent y cols., 2001).

En la actualidad, el papel en la epilepsia del sistema ORL1 – NC sigue sin esclarecerse y por lo tanto abierto a nuevas investigaciones. Estudios como a continuación expondremos, muestran en algunos casos modelos animales de epilepsia con procesos epileptogénicos proconvulsivos modulados por el sistema

ORL1 – NC y a su vez, paradójicamente en otros modelos epilépticos se observan procesos anticonvulsivos mediados por ORL1-NC.

En el estudio realizado con el antagonista de NC denominado J-113397, se observa una reducción de la susceptibilidad a presentar estatus epilépticos severos (tónico-clónicos) y en el número de crisis convulsivas inducidas por ácido Kaínico. A su vez, existe una disminución de la letalidad y el retardo en la presentación del estado convulsivo, aunque estos últimos no son significativos (Bregola 2002a). En ratones NC-*Knockout* con crisis inducidas por ácido Kaínico, también se observa reducción en la letalidad, retardo en la aparición de las crisis, con una significativa disminución del número de crisis inducidas y pérdida de la mayoría de comportamientos asociados a las crisis convulsivas inducidas por ácido Kaínico. Con dosis de NC 3nmol intra-cerebro ventricular (i.c.v.) se observa una recuperación del fenotipo silvestre en la susceptibilidad a las crisis (Bregola y cols., 2002b).

Los estudios realizados en ratones NC-*Knockout* con modelos de epilepsia del lóbulo temporal (basados en sobre estimulación eléctrica en amígdala), presentan un retardo significativo en la aparición de las crisis convulsivas, con un aumento en las descargas necesarias para lograr el desencadenamiento de las crisis y a su vez, los ratones NC-*Knockout* presentan crisis menos severas comparados con ratones normales (Binaschi y cols., 2003).

Por el contrario, en ratas, la epileptogénesis inducida por descargas eléctricas repetidas en la corteza piriforme muestra que dosis entre 1.25nM a 550nM de NC i.c.v. retardan progresivamente la aparición de los primeros estados convulsivos, aumentando en número de repeticiones necesarias para el desarrollo del estado epiléptico (Gutiérrez y cols, 2001).

En ratas, el incremento observado en el espectro electroencefalográfico EEG (ondas epileptiformes) producto de crisis convulsivas inducidas por Penicilina, se

atenúa con pre-tratamiento de NC 5.5 nM i.c.v. Los comportamientos asociados a las crisis como chillidos, sacudidas y convulsiones clónicas disminuyen o desaparecen completamente, siendo este efecto revertido por el antagonista [Nphe1]nociceptin (1-13)NH₂ (Feng y cols., 2004).

En otros trabajos, la NC 10 nM presenta una significativa disminución en el porcentaje de presentaciones de convulsiones clónicas inducidas por crecientes dosis (aumento del umbral) de Pentilenetrazona (PTZ), Ácido N-metil-D-aspartato (NMDA) y Biculina (BCC), sin presentar convulsiones en las primeras dosis. Respecto a las convulsiones tónicas de miembros traseros inducidas por electroshock no se encuentran afectadas por ninguna dosis de nociceptina (Rubaj y cols., 2002).

En resumen, los datos contradictorios expuestos en esta sección, sugieren que el papel del sistema ORL1-nociceptina durante los estados convulsivos es probablemente complejo y puede diferir entre los distintos modelos animales de crisis convulsivas o epilépticos utilizados (Carmona y cols., 2004), lo que hace necesario un mayor esfuerzo en la investigación del sistema ORL1- nociceptina utilizando nuevos modelos epilépticos y nuevas especies, que puedan aportar en el comprensión de los mecanismos que influyen sobre la respuesta del sistema ORL1- NC en el desencadenamiento y desarrollo de las crisis convulsivas.

5.4. La compleja función del sistema ORL1 y su papel en la modulación de múltiples comportamientos asociados a regiones cerebrales alteradas en los cuadros epilépticos.

Aunque el receptor ORL1 se considera un receptor de la familia de los receptores opiodes, el comportamiento en el sistema nociceptivo es muy distinto a lo visto en los receptores opiodes típicos, principalmente su escaso poder analgésico, aunque se considera un modulador de la nocicepción (Meunier y cols., 1995; Reinscheid y cols., 1995, Tian y cols., 1997). Pertenece a la familia de los receptores opiodes, interviene en la mediación y modulación del dolor en estructuras

supraespinales causando hiperalgesia, reversión de analgesia inducida por estrés reversión de analgesia no opiácea y acción antiopioide. En estructuras espinales puede producir hiperalgesia y alodinia, analgesia, antihiperalgesia/alodinia, así como otros efectos antiopioides como es la inhibición de la tolerancia a la morfina por el receptor μ (Ueda y cols, 2000).

El receptor ORL1 está altamente distribuido en el sistema nervioso central, así como su ligando endógeno nociceptina, particularmente en la región espinal y en las estructuras límbicas e hipotalámicas (Mollereau, y cols, 1994). Según su ubicación en el sistema nervioso puede mostrar efectos nociceptivos diferentes (Wang y cols., 1999). Por ejemplo, en la región supraespinal puede tener acción hiperalgésica, reversión de analgesia inducida por estrés, reversión de analgesia no opiácea y acción antiopioide, mientras que en el nivel espinal presenta hiperalgesia y alodinia, analgesia y antihiperalgesia/alodinia. Se ha observado que la nociceptina está implicada en la actividad locomotora (Reinscheid y cols, 1995), en la respuesta al estrés y la ansiedad (Jenck y cols. 1997) y en procesos de aprendizaje y memoria espacial (Sandin y cols. 1997). Según Mollereau y cols (1994), ORL1 puede estar jugando un importante papel en la modulación de numerosas funciones cerebrales, especialmente en los comportamientos instintivos y emocionales y por los altos niveles del receptor ORL1 en hipocampo y corteza frontal sugiere que la nociceptina puede intervenir en procesos de aprendizaje y memoria, homeostasis, atención y emociones, movimiento y procesos motores, secreción neuroendocrina y virtualmente, muchas de las modalidades de percepción sensorial.

Estudios sobre la actividad locomotora espontánea en ratones y ratas nos indican que la modulación del sistema ORL1–nociceptina presenta patrones de comportamiento ambivalentes (Florin y cols., 1996), en donde a altas dosis de nociceptina se puede observar un efecto inhibitorio (Devine y col.; 1996, Nishi y cols., 1997; Noda y cols., 1998; Calo y cols., 1998), mientras que a bajas concentraciones de NC se puede generar un aumento en la actividad locomotora (Kuzmin y cols., 2004).

A su vez, en diversos estudios comportamentales utilizando ratones *Knockout* para el receptor ORL1, se muestra un aumento en los procesos de aprendizaje y memoria (Nagai y cols., 2007; Manabe y cols., 1998; Mamiya y cols., 1998) posiblemente generado por una ganancia en los mecanismos de potenciación a largo plazo localizados en la región hipocampal CA1 (Manabe y cols., 1998) y una mejora cognitiva (Nabeshima y cols., 1999). En el Giro Dentado de ratas también se detecta una inhibición de la transmisión sináptica y de potenciación a largo plazo por NC a través de mecanismos postsinápticos (Yu y Xie, 1998), lo que nos indica su implicación en varias regiones del cerebro, fundamentales en la modulación de este comportamiento en especial. Redrobe y cols., (2000), muestran que la administración de nociceptina en la región CA3 del hipocampo produce un marcado daño en la capacidad de aprendizaje espacial, efecto que puede ser bloqueado por el antagonista ORL1 selectivo, [Nphe¹]nociceptina (1-13)NH₂. El efecto inducido por la nociceptina en la región CA3 hipocampal puede también mostrar un comportamiento bifásico como en la actividad locomotora, presentando déficit en la adquisición de memoria a altas dosis y facilitada a bajas dosis (Sandin y cols., 2004). El efecto negativo en la retención de memoria también puede ser revertido por antagonistas de NC como naloxona benzoilhidrazona (Mamiya y cols., 1999; Nabeshima y cols., 1999) mientras que el déficit causado por altas dosis de nociceptina en la memoria a corto plazo es bloqueado por nocistatina, aunque ésta no afecta a este comportamiento (Liu y cols., 2007).

También se ha observado que la nociceptina actúa como ansiolítico al ser administrado i.c.v en ratas y ratones en dosis entre 0.1 y 3 nM, observándose una reducción de la conducta defensiva ante estímulos estresantes (Jeck y cols., 1997; Jeck y cols., 2000; Gribel y cols., 1999) mientras la reducción de la dosis de NC (0.01-1 nmol) no presenta efecto antidepressivo en los ratones al realizar la prueba de natación forzada (*forced swimming test*) (Redrobe y cols., 2002). Sin embargo, Kamei y cols., (2004) en estudios con la prueba de la placa agujereada (*test Hole-board*), revela la existencia de una modulación también bifásica para nociceptina en este comportamiento. El papel del sistema ORL1-NC en la respuesta fisiológica a los

estímulos estresantes aún no está clara, ya que los fenotipos para ratones KO-nociceptina y ORL1-KO son contradictorios. nociceptina-KO presenta un fenotipo ansiogénico con un incremento en la susceptibilidad y en la respuesta adaptativa al estrés agudo y repetido, con un aumento en el umbral basal de la sensación dolorosa, comparado con los ratones silvestres (Köster y cols., 1999; Reinscheid y cols., 1999; Reinscheid y Civelli, 2002). Por otra parte, ORL1 OK no presenta este comportamiento ansioso (Nishi y cols., 1997; Mamiya y cols., 1998) y sí una respuesta antidepresiva, reduciendo el tiempo basal de inmovilidad en el *forced swimming test* (Gavioli y cols., 2003). Estas diferencias podrían indicar la presencia de subtipos adicionales de receptores o ligandos endógenos relacionados (Köster y cols., 1999; Reinscheid y Civelli, 2002).

En cuanto a los sistemas perceptivos se conoce que ORL1 y NC se expresan en regiones sensitivas del SNC como el bulbo olfativo, la retina y regiones troncoencefálicas auditivas (Houtani y cols., 2000; Letchworth y cols., 2000; Neal y cols., 1999b; Antón y cols., 1996; Kakimoto y cols., 2001) así como en la cóclea, especialmente en células ciliadas internas (Kho y cols., 2006). Nishi y cols., (1997) revela que el fenotipo de ratones ORL1-*Knockout* presenta un aumento en el umbral auditivo tras la exposición a intensos sonidos, concluyendo que el sistema. ORL1-nociceptina es esencial en la regulación de la capacidad auditiva.

6. Modelo animal de epilepsia utilizado en el estudio.

Como se dijo anteriormente, para comprender los mecanismos que influyen sobre la respuesta del sistema ORL1- NC en el desencadenamiento y desarrollo de las crisis convulsivas, es necesario establecer el papel del sistema ORL1– NC en nuevos modelos epilépticos y su influencia en las distintas redes neuronales que actúan en los distintos tipos de crisis epilépticas.

Para el estudio de las crisis epilépticas se han desarrollado múltiples modelos animales en diferentes especies como babuinos, conejos, gerbos, ratas y ratones. En

la figura 5, podemos observar los distintos modelos utilizados hasta el momento en el estudio de la epilepsia, haciendo hincapié en los modelos audiogénicos de rata y ratón, dado que es el referente del modelo que se ha empleado en el presente estudio

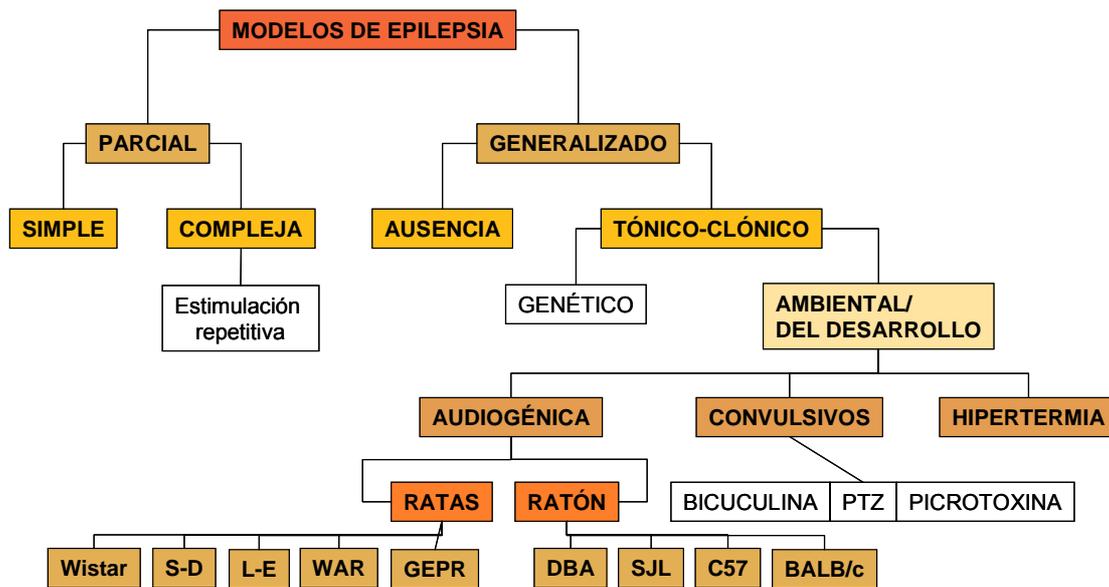


Figura 5: Esquema simplificado de modelos experimentales de epilepsia. Los modelos WAR y GEPR en ratas y DBA en ratones, también pueden estar dentro de la categoría “genética” pero se omite por simplificación. GEPR= *Genetically epilepsy-prone rat*; WAR= *Wistar audiogenic rat*, L-E= *Long-Evans rat*, S-D= *Sprague-Dawley rat* (Ross y Coleman, 2000).

En los párrafos siguientes hablaremos de las características de los modelos animales de crisis epilépticas producidas por estimulación auditiva, los comportamientos que subyacen a las crisis convulsivas y sus variaciones entre los distintos modelos. También mostraremos los posibles circuitos neurales implicados en los distintos tipos de crisis audiogénicas y por último nos centraremos en las características propias del nuevo modelo de crisis audiogénica empleado en el

presente trabajo y de los estudios que se están desarrollando hasta el momento sobre los cambios morfológicos y neuroquímicos presentes en estos animales, con el objetivo de una mayor comprensión de las bases subyacentes al inicio y propagación de las crisis convulsivas.

6.1 Modelos animales de crisis epilépticas producidas por estimulación auditiva.

Las epilepsias que se desencadenan en respuesta a una estimulación auditiva intensa reciben el nombre de crisis convulsivas audiogénicas (CCA). Las CCA están agrupadas dentro de las convulsiones generalizadas (no focales) según la clasificación descrita por la *International League Against Epilepsy* (1988). Los individuos propensos a padecer CCA presentan estos estados en forma de crisis clónicas o tónico-clónicas (conocidas como epilepsias del tipo *gran mal*), por otro lado, las crisis generalizadas conllevan pérdida de conciencia acompañadas de periodos alternos de los estados tónicos (rigidez muscular) y los estados clónicos (espasmos musculares rítmicos) (Ross y Coleman, 2000).

Las primeras observaciones en animales con CCA fueron hechas en 1924 por el laboratorio de Pavlov's en San Petersburgo y en el Instituto Wistar en Filadelfia, (Krushinsky y cols., 1970), desde entonces se han desarrollado numerosas variedades animales propensas a desarrollar CCA en rata y ratón (Figura 5). En ratas que presentan CCA, Jobe y cols., (1973) evalúan y clasifican por primera vez los parámetros de comportamiento que aparecen sucesivamente a través del estado epiléptico una vez iniciada la crisis. Se describe un primer estado que consiste en una carrera salvaje y desesperada que termina en un estado clónico, dando paso a un tercer estado tónico con un periodo de depresión post-ictal que en general está acompañado de pérdida de conciencia, inmovilidad (García-Cairasco y cols., 1992) y vocalizaciones (Terra y García-Cairasco, 1992).

Esta secuencia de estados estereotipados en la evolución de las crisis es el patrón base que presentan las especies de roedores propensos a desarrollar CCA, pero este patrón puede verse modificado según el modelo animal observado (Tabla 1). Las variaciones están principalmente relacionadas con la intensidad de la crisis, la latencia de la misma, la ausencia de comportamientos expuestos o la aparición de nuevos comportamientos.

Otros factores como la edad (maduración de la vía auditiva), los estímulos externos (por ejemplo el etanol y el ciclo circadiano), la estimulación continua o discontinua (Reid y Collins, 1986) o la intensidad del estímulo (Ross y Coleman, 1999), pueden afectar a los individuos en la expresión e intensidad de las crisis.

VARIEDAD	CARRERA SALVAJE	CLÓNICO	TÓNICO	Referencia
RATA inducida				
Wistar	*	*	O ^a	Pirson, 1988
Sprague-Dawley	*			Pirso, 1992
Long-Evans	*	*		Ross, 1999
Genéticamente susceptible				
WAR ^b	*	*	*	Garcia-Cairasco, 1991
GEPR-3	*	*		Mishra, 1989
GEPR-9	*	*		Mishra, 1988
RATÓN inducido				
SJL	*	*		Reid, 1982
C57	*	*	*	Henry, 1967
BALB/c	*	*	*	Saunders, 1972
Genéticamente susceptible				
DBA	*	*	*	Reid 1982

Tabla 1: Comportamientos característicos que presentan los distintos modelos animales más utilizados en el estudio de crisis convulsivas audiogénicas. a. Extensiones tónicas con extensión parcial tónica de miembros anteriores. b. Rata audiogénica Wistar.

En la variedad de ratas GEPRs (*genetically epilepsy-prone rats*) la colonia GEPRs-3s presenta crisis moderadas que culminan en convulsiones clónicas generalizadas. Tanto la colonia GEPRs-9s como la variedad Wistar susceptible a CCA, presentan crisis severas que culminan en estados convulsivos tónicos (Reigel y cols., 1986; Faingold, 1999) y en la actualidad se sugiere que existen adicionalmente comportamientos exploratorios anormales en esta última variedad antes y durante la estimulación acústica, con bajos niveles de ansiedad (García-Cairasco y cols., 1998).

En ratas GRPRs-3s la estimulación repetitiva puede desencadenar estados clónicos faciales y de miembros anteriores tras las crisis clónicas generalizadas, comportamiento observado también en ratas Wistar (Naritoku y cols., 1992; Dutra y cols., 2000). En las crisis producidas por ruidos fuertes en ratas con síndrome de abstinencia al alcohol también prevalecen los estados clónicos severos (González y cols., 1989; Riaz y Faingold, 1994).

6.1.1 Los circuitos implicados en la emergencia de las CCA (bases anatómicas)

Las CCA requieren la activación de la vía auditiva del tronco cerebral y en gran parte, el inicio de la crisis se desarrolla a través de las neuronas del colículo inferior (Ross y Coleman, 2000; García-Cairasco, 2002; Ribak y Morin, 1995; Sakamoto y Niki, 2001), aunque también están implicadas estructuras subcorticales (Millan y cols., 1986; García-Cairasco y cols., 1998; N'Gouemo y Faingold, 1999; Willott y Lu, 1980) y del cerebro anterior (Simler y cols., 1999).

Los circuitos implicados en los estados tónicos de las CCA son exclusivos del tronco encefálico, incluidas las estructuras auditivas como el núcleo coclear, el complejo olivar superior, el núcleo del lemnisco lateral y el papel crítico del colículo inferior (CI) (Faingold, 2004). Los subnúcleos del CI (núcleo central, corteza dorsal, núcleo intercolicular y corteza externa) desempeñan un mayor rol en las CCA y la

entrada de la señal auditiva es proyectada por la corteza externa hacia los núcleos efectores motores integrados en la red neuronal (Ribak y cols., 1994; Merrill y cols., 2003; Chakravarty y Faingold, 1997).

Las neuronas de la capa profunda del colículo superior son las mayores receptoras de los impulsos enviados desde el CI y su activación está implicada en que se desencadene la fase de carrera salvaje de las CCAs (Faingold y Randall, 1999; Yang y cols., 2001). La capa profunda del colículo superior tiene proyecciones directas al cordón espinal o por la vía de la formación pontina reticular y proyecciones a la región gris periacueductal (Yang y cols., 2001; Raisinghani y Faingold 2003), que a su vez proyecta al cordón espinal directa o indirectamente (Bajic y Proudfit, 1999; Mouton y Holstege, 1994). La sustancia gris periacueductal está implicada en la generación de la fase clónica de la CCA (N’Gouemo y Faingold, 1998; Yang y cols., 2003; Ishida y cols., 2002).

La implicación de la formación reticular pontina (FPR) está asociada al desencadenamiento de la fase tónica de las crisis (Faingold y Randall 1995; Faingold y Riaz, 1994) y es también dominante en el periodo de depresión post-ictal, siendo el único núcleo activo durante dicho comportamiento (Faingold, 1999). También se considera que la sustancia negra reticulada puede formar parte del circuito que modula las CCA. García-Cairasco y Sabbatini, (1991) describen que en ratas Wistar (inicialmente resistentes a presentar crisis) se incrementan las CCA severas al causarles lesiones unilaterales en la sustancia negra.

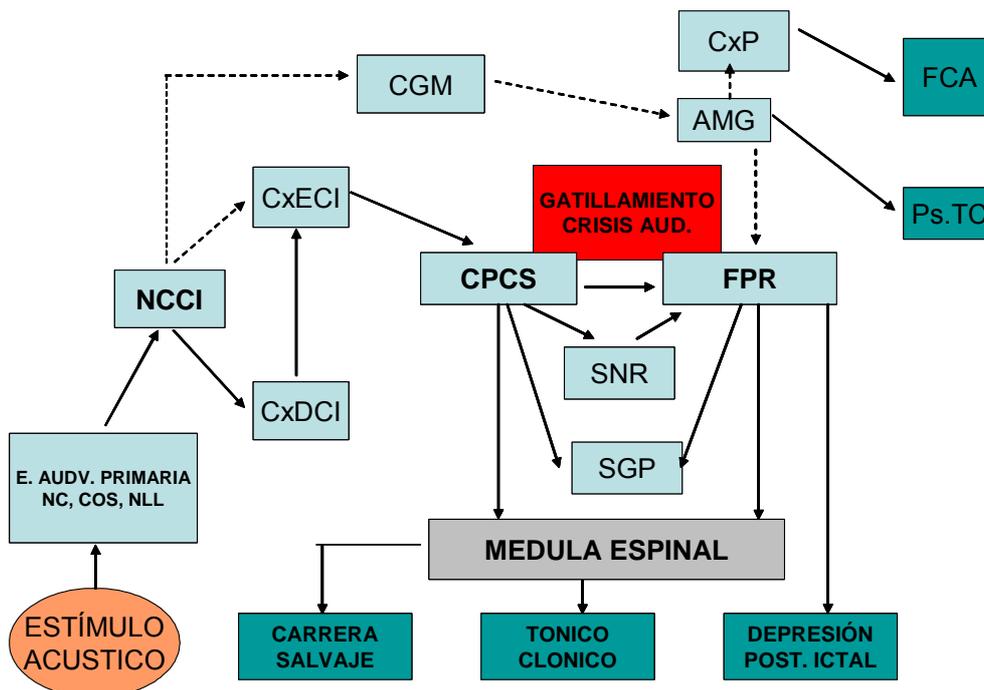


Figura 6: Diagrama esquemático de la asociación temporal de los núcleos críticos durante los estados convulsivos audiogénicos y los comportamientos que subyacen a la crisis. Cada aspecto comportamental es controlado por un núcleo específico durante la crisis: El núcleo central del Colículo inferior (**NCCI**) inicia la CCA, mientras la corteza externa del Colículo inferior (**CxECI**) la salida sensorial a los núcleos motores. La capa profunda del Colículo superior (**CPCS**) inicia la carrera salvaje, mientras la sustancia gris periacueductal (**SGP**) y la formación pontina reticular (**PRF**) controla el desencadenamiento de la fase clónica y/o tónica. La **PRF** solamente se activa durante la fase de depresión post-ictal. La amígdala (**AMG**) y el cuerpo geniculado medial (**CGM**), están relacionados con las crisis repetitivas CCA (*kindling*). **AMG** es un núcleo crítico en el estado clónico-tónico post-ictal (**PsTC**) en CCAs repetitivas y el corteza perirrinal (**CxP**) esta relacionado con estados clónicos en CCAs repetitivas durante comportamientos clónicos de miembros anteriores y músculos de la cara. **NC**= núcleo coclear; **NLL**= núcleo del lemnisco lateral; **COS**= complejo olivar superior; **SNR**= sustancia negra reticulada; **CxDCI**= corteza dorsal del Colículo inferior. (Faingold, 2004).

La inmensa interconexión de las neuronas de la FRP con multiplicidad de entradas y salidas de elementos sensoriales primarios y del sistema motor, hacen de esta región un sitio clave en la emergencia de los procesos nacientes de las CCA (Faingold, 2004). Las respuestas de las neuronas de la FRP son normalmente muy variables en la transmisión sensorial y su potencial de respuesta puede incrementarse de forma dramática, como en las CCA (Faingold, 2004). La simultánea y masiva

sincronización de los disparos neurales en esta región puede ser el punto de expansión de las crisis severas (Faingold, 2004).

La repetición de CCAs (*Kindling*) origina incrementos en la duración de las convulsiones y en la emergencia de actividad cortical epileptiforme observadas en estructuras del cerebro anterior (Naritoku y cols., 1992; Marescaux y cols., 1987; Garcia-Cairasco, 2002; DutraMoraes y cols., 2000). Este *kindling* genera cambios en el comportamiento que se presenta en las crisis como: estados clónicos de músculos de la cara y miembros anteriores al final de las crisis en ratas GEPR-3s (Naritoku y cols., 1992). La constante repetición de las CCAs, como podemos ver en la figura 6, recluta nuevas regiones de la red nerviosa que entran a dominar los estados finales de las crisis; las regiones involucradas son el cuerpo geniculado medial (Feng y cols., 2001), la amígdala (Raisinghani y Faingold, 2005a) y la corteza perhinal (Raisinghani y Faingold, 2005b), que a su vez, pueden nuevamente reclutar a la FRP en los estados clónicos de los músculos de la cara y miembros anteriores (Raisinghani y Faingold, 2005c). Además, se sugiere que el reclutamiento de los circuitos de la red nerviosa que forman parte de la corteza cerebral se hace de forma asimétrica durante las CCAs repetidas (Vinogradova y cols., 2006).

En resumen, los datos anteriormente expuestos nos permiten decir que existe una clara correlación entre la dominancia temporal de cada componente de la red y los cambios estereotipados y en secuencia predecible de las CCAs. Estas características especiales de los modelos animales propensos a las CCAs son una buena herramienta para el estudio de los mecanismos moleculares que afectan a la coherencia de los sistemas y que permiten el desencadenamiento de los distintos estados críticos de los procesos epilépticos.

6.1.2. Los hámsters GASH:Sal un nuevo modelo de CCA, utilizado en el estudio.

En la universidad de Salamanca, España, se ha desarrollado una línea de hámsters genéticamente propensos a padecer CCA denominada GASH: Sal. Esta línea, (según Muñoz, 2004) presenta crisis caracterizadas por una fase de latencia previa a la reacción y una fase de carrera salvaje, acompañada en algunos casos por vocalizaciones, micciones, ptialismo, defecaciones o caídas, que son seguidas de un periodo estuporoso de duración variable. Posterior a la fase de carrera se manifiesta una fase convulsiva tónico-clónica, caracterizada por signos cinéticos-posturales variables y sucesivos:

“Opistótono” (arqueamiento acusado del raquis, extremidades anteriores, cola, orejas enhiestas y espasmo en abducción de los miembros posteriores).

Convulsiones tónico-clónicas generalizadas con fase clónica en miembros anteriores y espasmo tónico en abducción de miembros posteriores.

Apertura tónica de la boca, flexión dorsoventral del cuello y tronco, cierre tónico de la boca, hiperextensión tónica de los miembros anteriores.

Hiperextensión tónica del tronco y de los miembros posteriores.

Estos comportamientos son acompañados en algunas ocasiones por comportamientos de micción, defecación, vocalizaciones, temblores o profusión testicular. La crisis convulsiva termina en un periodo de estupor arreactivo (Muñoz, 2004).

La gravedad de las crisis puede ser afectada principalmente por la edad de los individuos. Así, animales con CCA a los 30 días de nacidos muestran periodos de estupor más cortos, presentando crisis de menor gravedad. A los 45 días, se registran menores latencias de inicio de carrera salvaje y aumenta el número de animales con crisis graves. A los 60 días, se registra el mayor número de crisis de componente grave y a los seis meses de edad la latencia es mayor, así como el período estuporoso. Hay un incremento gradual en la seriedad de la crisis hasta los dos meses de edad. En la madurez (180 días), los animales presentan crisis más benignas, encontrándose fundamentalmente animales que presentan únicamente la fase de carrera (Muñoz, 2004).

La línea GASH:Sal se desarrolló a partir de una línea previa de hámsters que manifiestan CCA, denominada GPG/Vall (Soria y cols., 1987; Gil-Verona y cols., 1991, Gil-Verona, 1993). Esta línea de hámster propensos a CCA presenta anomalías morfológicas y neuroquímicas en la vía auditiva (Fuentes-Santamaría y cols., 2005), que incluyen pérdida de células ciliadas externas, células ganglionares espirales y disminución del volumen y tamaño celular en núcleos cocleares, núcleo del complejo olivar superior, núcleo del lemnisco lateral y Colículo inferior así como alteraciones de las concentraciones de las proteínas ligadoras de calcio en el CI y núcleos cocleares (Fuentes-Santamaría y col., 2005). Recientemente, se han observado, además, alteraciones morfológicas y neuroquímicas en el Colículo superior (CS), en especial una reducción del volumen celular e hipertrofia de la capa profunda del CS y disminución de las concentraciones de GABA e incrementos de los niveles de Taurina en esta línea de hámsters con CCA (Fuentes-Santamaría y cols., 2007).

Lo expuesto anteriormente, muestra que los hámsters GASH:Sal pueden ser un modelo adecuado para estudiar las posibles variaciones de la respuesta del receptor ORL1 en el desarrollo de crisis convulsivas, dada la secuencia de comportamientos en fases estereotipadas y predecibles propias para esta especie y que pueden ser correlacionadas con redes neurales que se van reclutando en el desarrollo de las crisis audiógenas.

Hipótesis y Objetivos

Es importante determinar si el efecto de la interacción básica receptor/ligando se comporta como un modelo no-lineal altamente influenciado por el contexto en los circuitos cerebrales que emergen en los estados convulsivos, produciendo respuestas variables en los individuos según el estado o coherencia del sistema ante estímulos externos inducidos.

En este proyecto nos hemos propuesto determinar si el receptor ORL1 tiene un efecto anticonvulsivo en las crisis audiógenas de origen tronco-encefálico, debido a su influencia en el balance de las respuestas de las redes neurales que desencadenan y propagan la actividad epileptiforme.

Para corroborar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la presencia del receptor ORL1 en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*)
2. Caracterizar molecularmente el receptor en el hámster dorado.
3. Determinar las estructuras cerebrales implicadas en las crisis convulsivas.
4. Analizar la expresión del receptor ORL1 en el hámster dorado control y GASH:Sal, tras el desencadenamiento de las crisis convulsivas.

Metodología

1. Diseño experimental.

Los animales de experimentación se llevaron al laboratorio, un día antes de la prueba para que se acondicionaran al nuevo lugar. Se registraron los datos de peso, sexo y edad de cada uno de los hámsters, tanto controles como GASH:Sal. Debido a la posible influencia circadiana sobre la susceptibilidad a la estimulación acústica, las pruebas se realizaron en la misma franja horaria del día (10 a 11 a.m.).

Los animales se dividieron en dos grupos experimentales. La serie 1 se utilizó para la clonación e identificación del receptor ORL1 en hámsters (*Mesocricetus auratus*), analizando la presencia de su RNA mensajero (mRNA) mediante la técnica de RT-PCR y secuenciación posterior del ADN resultante. Se trabajó con 3 hámsters GASH:Sal (n=3) y dos controles (n=2).

La serie 2 se utilizó para realizar las pruebas inmunohistoquímicas para la detección de la proteína Fos (n=3 GASH:SAL; n=3 Control) y del receptor ORL1 (n=4, GASH:Sal, n= 3, Control)

Para la serie 1, una vez se realizó y filmó la prueba de susceptibilidad audiogena (PSA), se dejaron reposar 30 minutos a los animales, posteriormente se decapitaron y se les extrajeron las regiones cerebrales hipocampo y corteza, las cuales fueron recogidas en *ependorf* sobre hielo seco y almacenadas posteriormente en arcones a – 80 °C para su posterior tratamiento.

Para la serie 2, nuevamente se realizaron las PSA y se dejaron reposar los animales 30 minutos. Posteriormente, los animales fueron perfundidos y se les extrajo el SNC y se dejaron reposar los cerebros 72h en una solución de sacarosa al 30% a 4°C. Finalmente, se obtuvieron secciones de los tejidos utilizando un micrótopo de congelación para su procesamiento inmunohistoquímico.

2. Animales de experimentación.

Para el presente estudio se utilizaron dos líneas de hámsters sirios (*Mesocricetus auratus*); una de estas líneas es la cepa con alteración genética audiógena GASH:Sal, diseñada por el Doctor Luis Muñoz de la Pascua en su tesis doctoral dirigida por la Doctora Maria Dolores E. López García y que se encuentra actualmente en el animalario Departamental (P.A.E. SA- 001) de la Universidad de Salamanca y la segunda línea son los hámsters dorados normales Lak: LVG (SYR) BR procedentes de la empresa Charles River, Barcelona y usados como animales control.

Los animales se mantuvieron en estabularios en condiciones constantes de temperatura (22° C), humedad (60 %) y ciclo de luz y oscuridad (12h/12h). Los animales fueron cuidados por personal especializado, según recomendaciones de FELASA (Federación europea de asociaciones de animales de laboratorio) siguiendo la legislación vigente (RD 223/88) y las recomendaciones del convenio Europeo para la protección de animales vertebrados utilizados en experimentación y otros fines científicos (DOCE L 222;24-08-1999).

3. Metodología.

3.1 Prueba de susceptibilidad audiógena (PSA)

El estímulo acústico empleado consistió en un ruido blanco generado digitalmente mediante CoolEdit Pro (v. 1.2, Sintrillium Software Coop. Suite 104, Phoenix, AZ 85251) con una frecuencia de muestreo de 44.100 Hz. La duración del estímulo fue de 60 s. Se reproduce mediante un monitor de estudio auto-amplificado (Marca Behringer, Mod. Truth B2031, Alemania) conectado directamente a la salida en línea de la tarjeta de sonido del ordenador a una intensidad de 90 dB SPL medida en el punto medio donde se sitúa el animal.

Mediante la prueba de susceptibilidad audiógena (PSA), analizamos tanto la susceptibilidad a padecer las crisis convulsivas audiógenas, en estado normal, como las distintas fases de las crisis en cuanto a su presencia, duración y características.

Elegimos animales de 60 días de edad ya que son más susceptibles al sonido.

Los animales se introducen en una lámina circular de metacrilato transparente de 37 cm de diámetro y 20 cm de altura, colocando una cámara digital (Sony TRV-8E) a 60 cm de altura en posición cenital para grabar las crisis. Tras un periodo de aclimatación de 1 minuto, se somete a los animales al estímulo sonoro durante 50 segundos hasta el inicio de la crisis audiógena. La crisis se graba en vídeo en su totalidad hasta que el animal se recupere del período de estupor.

3.2. Caracterización molecular del receptor opioide en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).

A los animales se les inyectó una única dosis intraperitoneal de morfina (1mg / Kg) durante 30 minutos antes de la medición de la prueba de susceptibilidad audiógena (PSA), realizada en la misma franja horaria.

Una vez realizada y filmada la PSA, se dejó reposar 30 minutos al animal, se decapitó y se extrajeron las estructuras cerebrales Hipocampo y Corteza frontal de cada uno de los animales utilizados, para su procesamiento posterior, recogiendo las mismas en eppendorf sobre hielo seco.

3.2.1 Extracción de RNA total.

Para la extracción de RNA total de tejido se empleó una modificación del método de Chomczynski y Sacchi (1987), usando el reactivo Trizol™ (GIBCO-BRL). Para ello, se utilizó 1 ml de Trizol por cada 100 mg de tejido, y se procedió a la homogeneización del mismo mediante un homogeneizador (*Brinkmann Polytron- PT 3000*, LABEQUIP LTD. Ontario, Canadá). Tras incubar el preparado durante 5 min a temperatura ambiente, se realizó una extracción selectiva del RNA por separación de fases mediante la adición de 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol y centrifugación a 12000 g durante 15 min a 4 °C. El RNA obtenido en la fase acuosa superior se precipitó con un volumen de isopropanol igual a la mitad del Trizol utilizado en el primer paso, se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C y, finalmente,

después de eliminar el sobrenadante y secar el RNA, se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpírocarbonato 0,1%, Sigma), incubando a 60 °C durante 10 min para favorecer la disolución del mismo en caso de ser necesario. La concentración del RNA se determinó por espectrofotometría a 260 nm, y se comprobó que la relación A260/280 se encontraba entorno a 2,0 correspondiente a muestras puras. Adicionalmente se pudo comprobar la “calidad” del RNA (no degradación) mediante el chip “RNA 6000 NanoLabChip” (Agilent, Palo Alto, CA, USA) empleando el bioanalizador Agilent 2100 a través del cual podíamos determinar la integridad del RNA mediante la visualización de las bandas de rRNA 18S y 28S.

3.2.2 RT-PCR.

Las RT-PCRs se llevaron a cabo en dos pasos; un primer paso consistente en la retrotranscripción de los RNA mensajeros (síntesis de cDNA), seguido de una amplificación selectiva mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la síntesis de cDNA se utilizó el kit *ImProm-IITM Reverse Transcripción System* (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente se desnaturalizó por calor una mezcla de 1 µg de RNA total y 0,5 µg del oligonucleótido (dT)₁₅ a 70 °C durante 5 min, tras lo cual se enfrió en hielo. Esta reacción se añadió a una mezcla preparada previamente que contiene 1µl de transcriptasa inversa *ImProm-IITM*, 4 µl de buffer 5 X *ImProm-IITM*, MgCl₂ 1,5-8,0 mM, una mezcla de dNTP (desoxinucleótidos tri-fosfato) 0,5 mM, 20 U del inhibidor de ribonucleasas *Recombinant RNasin[®]* y agua libre de RNasas (ddH₂O tratada con DEPC) hasta un volumen final de 15 µl. La reacción se sometió durante 5 min a 25 °C, lo que permitió que el cebador anille con el RNA molde; posteriormente se incubó a 42 °C durante 1 hora, para que la transcriptasa sintetice el cDNA. Finalmente la transcriptasa inversa se inactiva incubando 15 min a 70 °C las mezclas de reacción. Para comprobar que la síntesis de cDNA se realizó con éxito, se llevó a cabo una amplificación por PCR de un fragmento de cDNA correspondiente a un gen *housekeeping*, tal como el de la α-actina de rata (número de GenBank, NM_031144. rt-b-act-for: AGCCATGTACGTAGCCATCC, y rt-b-act-rev: ACCCTCATAGATGGGCACAG; en la

PCR se obtiene un fragmento esperado de 115 pb, el cual se expresa constitutivamente en todos los tejidos.

Por su parte la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo con el Kit *PCR Master Mix* (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se añadieron al tubo de reacción una mezcla de reacción (Tris-HCl 22 mM, pH 8.4, KCl 55 mM, MgCl₂ 1,65 mM, dNTPs 220µM y 22 U de *Taq* DNA polimerasa), 100 ng de DNA y 0,2 µg de cada oligonucleótido específico. En este caso y debido a la gran proximidad filogenética de la ratón (*Mus musculus*) con el hámster, hemos utilizado unos cebadores diseñados a partir de la secuencia de cDNA del receptor opioide-like de ratón ya clonado (número de GenBank: BC051982, mmORL1-F: GTGGCTTTGCAGGGTGAC y mmORL1-R: GGGTGTAGATGGGCTCGTG) que nos darían un producto de un tamaño esperado de aproximadamente 1178 pb. El volumen final de reacción fue de 25 µl y siempre se realizó una reacción sin DNA molde como control negativo. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer (Geneamp® PCR system 9700) utilizando el siguiente programa: 94 °C, 5 min; 35 ciclos (94 °C, 30 s; 54 °C, 30 s; 72 °C, 1 min); 72 °C, 10 min.

A continuación, los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa embebidos en TBE 1 X (para un litro: 10,8 g de Tris base, 5,5 g de ácido bórico, 0,4 ml de EDTA 0.5 M pH 8,0). Previamente, el producto de reacción se mezcló con tampón de carga que contiene dos colorantes, el xileno-cianol y bromofenol que migran aproximadamente con fragmentos de 5,0 y 0,5 kb respectivamente en geles de agarosa al 0,8 %. Paralelamente, en los geles se incluyó un marcador de peso molecular. La visualización del DNA tras la migración se realizó incubando el gel en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 20 min. Este colorante actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emite fluorescencia al exponerse a la luz ultravioleta (Johnson y Grossman, 1977). El patrón de migración de fragmentos se registró con el sistema de documentación de imágenes GelDoc™ XR.

3.2.3 Purificación de los fragmentos amplificados por PCR.

Los fragmentos de DNA amplificados por PCR se visualizaron como bandas en un gel de agarosa. Las bandas de interés se aislaron y se purificaron usando el producto Concert Rapid Gel Extraction System (GibcoBRL), siempre siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, la agarosa conteniendo el DNA se fundió a 60 °C durante 15 min en tampón de solubilización (L1). Esta mezcla se añadió a un cartucho con una membrana especialmente diseñada para retener el DNA y se centrifugó 1 min a 13000 rpm. El cartucho se incubó durante 5 min con tampón de lavado (L2), que contiene etanol, y se centrifugó dos veces durante 1 min a 13000 rpm. Finalmente, el DNA se eluyó con tampón TE pH 8 precalentado a 60°C.

3.2.4 Secuenciación automática de DNA.

Las reacciones de secuenciación automática de DNA se llevaron a cabo en el servicio central de secuenciación de la Universidad de Salamanca, que está dotado de un secuenciador automático ABI Prism[®]. Para ello se mezclaron en un tubo eppendorf 5 µl de DNA plasmídico, que equivalen a 400-600 ng de DNA, con 3 µl de oligonucleótido, que equivalen a 3 pmoles. Los resultados de la secuenciación, cromatograma y texto, fueron enviados por correo electrónico para ser analizados posteriormente.

3.2.5 Análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias recibidas desde el servicio de secuenciación automática de la Universidad de Salamanca se realizó con los programas *EditView* (ABI Automated DNA Sequencer Viewer, Perkin Elmer) y Chromas 2.23 (Technelysum Pty Ltd)

Otros programas informáticos han sido utilizados para el análisis de secuencias de DNA y el diseño de oligonucleótidos (<http://www.up.univ-mrs.fr/~wabim/english/logligne.html>]; <http://www.bioinformatics.org/sms/>). La página del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a

través del programa *BLAST* o *FASTA* permitió comparar nuestras secuencias con las encontradas en la base de datos *Gen Bank*. La página del EMBL (*European Bioinformatics Institute*: <http://www.ebi.ac.uk/>), también sirvió para comparar secuencias. Gracias al programa *CLUSTALW* (www2.ebi.ac.uk/clustalw) se realizaron alineamientos de secuencias. El diseño de oligonucleótidos se realizó con ayuda del programa *Oligo4.05 Primer Analysis Software* (*National Biosciences, Inc*).

3.3. Histología.

3.31. Obtención del material biológico.

Los animales utilizados para el estudio de los núcleos cerebrales, fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/ Kg de peso por vía i.p.), comprobado su estado arrefléxico, se procedió a perfundir los animales por vía aórtica. El proceso de perfusión se realiza en dos fases, la primera es un lavado del árbol vascular, empleando aproximadamente 150 ml de solución Ringer libre de calcio (NaCl 0,85%, KCl 0,025% y NaHCO₃ 0,02% en agua destilada, t^a = 37 °C y el pH= 6,9 ajustado con CO₂). En la segunda fase se hace una fijación de los tejidos, empleando para cada animal 200 ml de paraformaldehído (4% en tampón fosfato [TF] 0,1 M, pH= 7,4, t^a= ambiente). Concluido el proceso de perfusión, se extrajo el cerebro sobre una placa de hielo, se separaron las meninges, y se orientó el plano de corte, para que fuera similar en todos los casos. Los cerebros se mantuvieron en sacarosa al 30% en solución amortiguadora de fosfato 0,1M, pH 7,4 (TF) durante 72 h a 4 °C para minimizar los daños por la posterior congelación (crioprotección).

Mediante el empleo de un micrótopo de congelación (#HM430 Micron, Heidelberg, Alemania), se obtuvieron secciones histológicas de 40 µm de grosor y de forma seriada en el plano coronal. Las secciones histológicas de cada cerebro se recogen alternativamente en una serie de 4 pocillos en TF y se procesan por el método de flotación libre.

3.3.2. Técnicas de tinción inmunohistoquímicas.

De la serie de cuatro pocillos, uno de ellos se procesó inmunocitoquímicamente para visualizar la proteína del gen de expresión temprana *c-fos*, utilizado como un índice muy confiable de la actividad neuronal, tanto espontánea como en respuesta a la estimulación transináptica. El segundo pocillo se procesó para la visualización del receptor opioide ORL1. El tercer pocillo se procesó con una mezcla de anticuerpos anti ORL1 y anti FOS y finalmente, en el cuarto pocillo los cortes de tejido cerebral fueron objeto de tinción de Nissl (ver protocolo en Anexo) que utilizamos como referencia citoarquitectónica, dado que esta tinción marca nítidamente todos los somas y las sustancias tigroides en las neuronas, lo que nos permitió delimitar los núcleos cerebrales con mayor facilidad y por tanto, facilitó la ubicación de las regiones cerebrales donde observamos expresión de las proteínas de nuestro interés. Las secciones de los tres primeros pocillos se incubaron durante 72 h a 4°C con anticuerpo primario específico en solución TBS 0,05M; SFV 10%(ó leche en polvo 5%) y Tritón-Tx 0,3% en pH 7,4.

- Para *c-fos* se utilizó sc-52 hecho en conejo, (# SC52, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), dilución 1/2500.

- Para ORL1 se utilizó el anticuerpo denominado KOR3 hecho en cabra (# N-19 SC9759 goat, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), dilución 1/250.

Tras tres lavados con tampón fosfato 0,1M y pH 7,4, realizamos la incubación en anticuerpo secundario biotinado durante una noche a 4°C. Para *c-fos* se hizo con anti inmunoglobulinas G de conejo biotinado hecho en cabra (1/200 diluido en 0,3% de Tritón X- 100 (#T9284, sigma, St. Louis, MO, USA) y suero bovino fetal 1%. El procedimiento se hizo en 10 ml de TBS-Tx pH7,4 añadiendo una gota (50 microlitros) de anticuerpo secundario (1/200 Biotinylated anti-Rabbit IgG; #BA-1000, Vector Labs Burlingame, CA, USA). Para KOR3 se empleó suero anti IGg de cabra biotinado hecho en conejo (1/200 diluido en 0,3% de Tritón y suero bovino fetal 1%) (#BA-500, Vector Labs).

3.3.3. A) Preparación del tejido para la observación al microscopio óptico.

Para visualizar los marcadores usados, se empleó el método de avidina-biotina, conocido como sistema ABC (# PK 4000, Vector Labs.), que se basa en la elevada afinidad que posee la molécula de avidina por la biotina, una de las más altas que se conoce (constante de disociación 10^{-15} M). El principio del método consiste en el empleo de un complejo formado, en nuestro caso, por la enzima peroxidasa, unida a avidina por medio de moléculas de biotina. Sobre la base de la elevada afinidad de la avidina por la biotina, el complejo se prepara de forma tal que, en la molécula de avidina, quedan sitios libres para que se puedan unir más moléculas de biotina, a antisueros secundarios biotinados. De esta manera, para visualizar la presencia de un determinado antígeno, hay que añadir un compuesto que al reaccionar con la enzima peroxidasa, produzca una coloración visible; para ello empleamos la 3,3'-diaminobencidina (DAB) que, en presencia de H_2O_2 , se oxida y produce un precipitado de color marrón.

Por último, montamos las secciones en láminas portaobjetos, deshidratadas en alcohol y que fueron aclaradas en xileno y cubiertas con. Entellan®Neu.

B) Preparación del tejido para la observación al microscopio confocal.

El estudio a microscopía confocal requirió el empleo de anticuerpos secundarios fluorescentes, unidos al fluorocromo Cy2 para visualizar ORL1 o al fluorocromo Cy5, para visualizar la expresión de *c-fos*. De esta forma, las secciones de 40 μ m obtenidas en el micrótopo de congelación fueron recogidas en PB 0,1M pH 7,4. Transcurrida una hora, incubamos las secciones en una solución que contenía un cóctel de anticuerpos primarios formado por el antisuero Anti-KOR y anti-Fos, tal y como se describió en el apartado anterior. La incubación en el cóctel se realizó durante 48 horas a 4°C y en oscuridad. Después de varios lavados en TBS 0,05M pH 7,6 incubamos las secciones con un cocktail de anticuerpos secundarios, uno de ellos unido al fluorocromo Cy2 (Ig G de ratón contra Ig G de cabra; #205-225-108, Jackson, dilución 1/200) y otro al fluorocromo Cy5 (Ig G de burro contra Ig G de conejo; #711-175-152, Jackson, dilución 1/200) durante dos horas a temperatura ambiente y en

oscuridad. Finalmente, montamos las secciones sobre portaobjetos con un medido de “antidesvanecimiento” para la fluorescencia,. Sellamos el cubreobjetos con pegamento y almacenamos las secciones protegidas de la luz y a 4°C hasta su estudio en el microscopio confocal.

4. Análisis de las secciones histológicas.

4.1 Obtención y procesamiento de las imágenes de microscopía óptica.

Las secciones se estudiaron, dibujaron y fotografiaron con un microscopio Leica DMRB equipado con lentes objetivo Pan-Neofluar de 2,5x (A.N. = 0,07), 5x (A.N. = 0,12), 10x (A.N. = 0,30), 20x (A.N. = 0,50), 40 x (A.N. = 0,70), y 100x de inmersión en aceite (A.N. = 1,40).

Las fotografías de las secciones fueron tomadas con una cámara digital Olympus DP-70 acoplada al microscopio. Una vez almacenadas las imágenes en un ordenador, a fin de ajustar exclusivamente el brillo, el contraste y el equilibrio de color de las ilustraciones, cada documento digital fue tratado con el programa Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems).

Los esquemas de las zonas de inyección y la composición de las distintas figuras fueron elaborados con el programa Canvas 7.0. Se utilizó el atlas estereotáxico de cerebro para hámster dorado (Lawrence y cols., 2001) y las planchas seriadas procesadas histoquímicamente para visualizar la acetilcolinesterasa empleadas de rutina en el laboratorio (Fuentes-Santamaría, 2002) como modelos para ordenar caudo-rostralmente las secciones y como referencias citoarquitectónicas.

Todas las imágenes fueron combinadas y maquetadas para formar planchas con la ayuda del programa Canvas 7.0. En algunos casos, dibujamos los contornos de las secciones en una distribución rostro-caudal a fin de plasmar esquemáticamente los resultados de los experimentos. Finalmente, las imágenes y planchas fueron impresas con una impresora de inyección de tinta Phaser 750DX.

4.2 Obtención y procesamiento de las imágenes de microscopía confocal.

Las secciones fueron examinadas bajo un microscopio de epifluorescencia (Leica Aristoplan; Leica Microsystems, Bensheim, Alemania) equipado con los filtros apropiados para observar los siguientes fluorocromos, cianidina 2 (Cy2) y cianidina 5 (Cy5) o mediante un microscopio de láser confocal (Leica TCS SP2; Leica Microsystems, Mannheim, Germany) acoplado a un microscopio Leica DM IRE2 invertido con láser de argón y de helio-neón con capacidad de proporcionar longitudes de onda de excitación de 458, 476, 488, 543, 568 y 650 nm. Los fluorocromos Cy2 y Cy5 fueron detectados secuencialmente plano por plano mediante un sistema de filtros ópticos, usando una longitud de onda de 488nm para excitar el Cy2 y de 650 nm para el Cy5. El contraste de fondo fue controlado y ajustado para la máxima sensibilidad en el rango de cada longitud de onda. Las imágenes fueron codificadas en verde para el Cy2 y en azul para Cy5. Empleamos el objetivo de inmersión en aceite PlanApochromat 63X que proporciona una resolución de aproximadamente ~150 nm en el plano X-Y y ~300 nm a lo largo del eje Z. Además, usamos varios aumentos digitales hasta 1,58X. Finalmente, el brillo, el contraste y el color fue ajustado para todas las imágenes mediante el programa Leica Confocal 2.61 y el programa Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems).

5. Análisis estadístico

Los datos para comparar el número de células neuronales que expresan c-fos tras una estimulación auditiva fuerte se analizaron con el programa *Graph Pad Prism*. Se utilizó el estadístico t - de *Student*, se obtuvieron las medias, la desviación estándar y el error estándar de cada grupo estudiado. Se trabajó con un intervalo de confianza del 95%, 2 grados de libertad y niveles de significancia de $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$. La comparación se realizó entre los controles y los GASH:Sal.

Resultados

1. Caracterización molecular del receptor opioide en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*)

Hasta el momento la caracterización molecular completa del receptor opioide like (ORL1) ha sido demostrada en distintas especies de vertebrados mediante clonación (Tabla 2). Concretamente, este gen se conoce en los mamíferos (ratón, humano, rata, jabalí y perro), aves (pollo), anfibios (tritón y dos especies de rana), y en el pez teleósteo cebra.

VERTEBRATE	Nombre común	Nombre gen	Nº GenBank	References
<u>MAMMALIA</u>				
<i>Mus musculus</i>	ratón	mmORL	AAH50885.1	Nishi y col., 1994
<i>Homo sapiens</i>	humano	hsORL	CAC17003.2	Mollereau y col., 1994
<i>Rattus norvegicus</i>	rata	rnORL	AAN77720.1	Chen y col., 1994 ; Bunzow y col., 1994 ; Wang y col., 1994 ; Wick y col., 1994; Fukuda y col., 1994
<i>Sus scrofa</i>	jabalí	ssORL	NP_999341.1	Osinski y col., 1999
<i>Canis familiaris</i>	perro	cfORL	XP_543110.2	
<u>AVES</u>				
<i>Gallus gallus</i>	pollo	ggORL	XP_417424.2	-
<u>AMPHIBIAS</u>				
<i>Taricha granulosa</i>	tritón	tgORL	AAU26067.1	Walthers y col., 2005
<i>Rana pipiens</i>	rana	rpORL	AAR08905.1	-
<i>Xenopus laevis</i>	Rana africana	xlORL	AAP35234.1	-
<u>TELEOSTEI</u>				
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	zfORL1	NP_991152.1	-Rivas-Boyero2003
		zfORL2	XP_685416.1	-Rivas Boyero 2003

Tabla 2. Especies de vertebrados donde se ha caracterizado molecularmente el receptor opioide like.

En base a estos datos y empleando las bases de datos disponibles en internet de secuencias correspondientes al gen ORL1 clonado en distintas especies, concretamente el transcrito ORL1 de ratón, diseñamos cebadores hipotéticamente específicos a su homólogo-ortólogo en el hámster. Así, seleccionamos una pareja de oligonucleótidos que amplificarían la totalidad de la región codificante de este gen de forma que a partir de la secuencia nucleotídica resultante obtuviéramos el marco de lectura adecuado que traduciría la putativa proteína.

Seguidamente optimizamos las condiciones de RT-PCR utilizando los mencionados oligonucleótidos y mRNAs, previamente extraídos y purificados, procedentes de distintas regiones cerebrales de hámster (*Mesocricetus auratus*) y cerebro de rata, éste último utilizado como control positivo. Como resultado de esta técnica amplificamos un producto de PCR mayoritario que sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1 %, resultó tener un tamaño de 1104 pares de bases, muy similar al tamaño esperado en el caso de amplificación utilizando el control positivo (Figura 7).

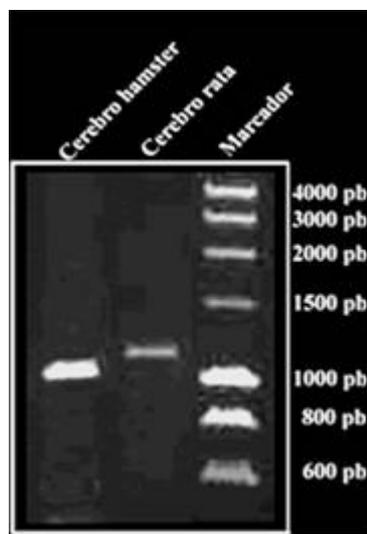


Figura 7.- RT-PCR sobre mRNA de cerebro de hamster y rata (Control positivo) con los oligonucleótidos rnORL-for y rnORL-rev. Imagen obtenida mediante fotografía bajo luz ultravioleta de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (imagen invertida). En el carril de la derecha se muestra el patrón de peso molecular con los tamaños en pares de bases.

A continuación se procedió a aislar el producto de PCR mayoritario del gel de agarosa para su purificación en columnas de cromatografía y posterior análisis de su secuencia mediante secuenciación automática. La secuenciación del fragmento amplificado por RT-PCR mostró que contenía una secuencia de 1104 pb que podía codificar un marco de lectura abierto de 367 aminoácidos (Figura 8). Esta proteína contenía una estructura primaria análoga a la descrita en los receptores opioides, con siete dominios hidrofóbicos, que es la característica común de la mayoría de los receptores que se acoplan a proteínas G, como son los mismos receptores opioides (Chen y col., 1994). También, este receptor se estimó que tenía un peso molecular teórico aproximado de 40.56 kDa y contenía los mismos residuos aminoacídicos (367) identificados en ORL1 de rata (Wick y col., 1994; Chen y col.,1994; Wang y col.,1994; Bunzow y col.,1994; Fukuda y col.,1994; Lachowicz y col.,1995) y ratón (Nishi y col.,1994; Pan y col.,1996). Adicionalmente, tanto la secuencia nucleotídica como la aminoacídica presentaban una muy alta homología a todos los genes ortólogos y proteínas ORL1 descritos hasta el momento en distintas especies de vertebrados. Concretamente, a nivel de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas nuestra secuencia presentaba una homología del 92-93 % y 97-98 % con la de las especies, rata y ratón (Figuras 9 y 10).

Por todo lo descrito anteriormente, nosotros podemos concluir que el transcrito secuenciado se corresponde con el del receptor opioide like de hámster, *M. auratus* (maORL), y su secuencia ha sido depositada en las bases de datos de EMBL-GenBank con el número de acceso (número de GenBank EF517496).

```

atggagtcacctctttcctgccccattctgggaggtcttgtatggcagccactttgaaggc      60
M E S L F P A P F W E V L Y G S H F E G 20
•
aacctgtccctcctaaacgagactgtaccccaccacctgtgctcaatgctagccacagt      120
N L S L L N E T V P H H L L L N A S H S 40
gccttctgcccccttgactcaaggtcaccatcgtggggctctacttggtgtgtgcatc      180
A F L P L G L K V T I V G L Y L A V C I 60
ggggggctgctggggaactgcctcgtcatgtatgtcaccctcaggcataccaagatgaag      240
G G L L G N C L V M Y V I L R H T K M K 80
acagctaccaacatttatatatttaactctggcactggctgataccctggctcttctgctgaca      300
T A T N I Y I F N L A L A D T L V L L T 100
ctgcccttccagggcacagatatcttattgggcttttggcgtttgggaatgcactatgc      360
L P F Q G T D I L L G F W P F G N A L C 120
aagactgtcatcgctattgactactacaacatggtccaccagcactttcacccctgactgcc      420
K T V I A I D Y Y N M F T S T F T L T A 140
atgagtgtagaccggttatgtggccatctgccaccctatccgtgcccttgatggtcggaca      480
M S V D R Y V A I C H P I R A L D V R T 160
*
tccagcaaaagccaggctattaatgtggccatattgggcccctggcttcagtggttggtgtt      540
S S K A Q A I N V A I W A L A S V V G V 180
* *
cctgttgcctcatgggctcagcacaagtggaggatgaagagatcgaatgcctggggag      600
P V A I M G S A Q V E D E E I E C L V E 200
atccctgccccctcaggactactggggccccgtgttgccatctgcatcttccctttttcc      660
I P A P Q D Y W G P V F A I C I F L F S 220
ttcatcatccctgtgctgatcatctctatctgctacagcctcatgattcggcggtccgt      720
F I I P V L I I S I C Y S L M I R R L R 240
gggtgctcgtctgctttcaggctcccagagagaaggaccggaacctgggcggtatcacacgg      780
G V R L L S G S R E K D R N L R R I T R 260
* *
ctgggtgctgggtgggtgctgtgtgttgggtctgctggacaccctgcaagctcttctgtg      840
L V L V V V A V F V V C W T P V Q V F V 280
ttgggtccaaggactgggtgttcagccaggcagtgaggcggcagtagccatcctgctgcttt      900
L V Q G L G V Q P G S E A A V A I L R F 300
tgcacagcctgggctatatcaacagctgctcaacccattctctatgctttcctggat      960
C T A L G Y I N S C L N P I L Y A F L D 320
•
gagaactttaaggcctgcttttagaaagtctgctgtgcttcagccttgaccgggagatg      1020
E N F K A C F R K F C C A S A L H R E M 340
caggtttctgaccgtgtgctgagcattgcccaaggatgtgggccttgcttgaagacttct      1080
Q V S D R V R S I A K D V G L A C K T S 360
* *
gagacagtaccacggccggcatga      1104
E T V P R P A - 367

```

Figura 8. Secuencia nucleotídica del cDNA del receptor opioide-like de hamster (maORL) y predicción de su secuencia aminoacídica. Cada uno de los siete dominios transmembrana y los tres lazos extracelulares se marcan en gris y subrayados, respectivamente. Los tres sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Thr) se muestran en amarillo; un par de residuos Cys conservados en los lazos extracelulares 1 y 2 que pueden conectarse mediante la formación de un puente disulfuro se indican en verde y tres residuos de Cys susceptibles de sufrir palmitoilación se marcan en azul. Por su parte, los sitios de fosforilación (7/2/3) serina (*), treonina (¶) y tirosina (Δ) fueron también detectados en la secuencia aminoacídica deducida.

mmORL1	CCTGCCTGCCTTTCTGCTAAGCATTAGGGTCTGTTTTGGCCAGCTTCTGAAGAGTGTG	60
rnORL1	-----	
maORL1	-----	
mmORL1	GTGTGCTGTTGGAGAACTGTACTGAGTGGCTTTGCAGGGTGACAGCATGGAGTCCCTCT	120
rnORL1	-----ATGGAGTCCCTCT	13
maORL1	-----ATGGAGTCCCTCT	13

mmORL1	TTCTGCCCATTTCTGGGAGTCTTGTATGGCAGCCACTTTCAGAGGAACCTGTCTCTCC	180
rnORL1	TTCTGTCTCCATACTGGGAGTCTTGTATGGCAGCCACTTTCAGAGGAACCTGTCTCTCC	73
maORL1	TTCTGCCCATTTCTGGGAGTCTTGTATGGCAGCCACTTTCAGAGGAACCTGTCTCTCC	73

mmORL1	TAAATGAGACCGTACCCCATCACCTGCTCCTCAATGCTAGCCACAGTGCCTTCTGCCCC	240
rnORL1	TAAATGAGACCGTACCCCATCACCTGCTCCTCAATGCTAGCCACAGTGCCTTCTGCCCC	133
maORL1	TAAACGAGACTGTACCCACCCCTGCTGCTCAATGCTAGCCACAGTGCCTTCTGCCCC	133

mmORL1	TTGGACTCAAGGTACCACATCGTGGGGCTCTACTTGGCTGTGTGCATCGGGGGCTCTGG	300
rnORL1	TTGGACTCAAGGTACCACATCGTGGGGCTCTACTTGGCTGTGTGCATCGGGGGCTCTGG	193
maORL1	TTGGACTCAAGGTACCACATCGTGGGGCTCTACTTGGCTGTGTGCATCGGGGGCTCTGG	193

mmORL1	GGAAGTGCCTCGTCATGTATGTATCCTCAGGCACACCAAGATGAAGACTGTACCAACA	360
rnORL1	GGAAGTGCCTCGTCATGTATGTATCCTCAGGCACACCAAGATGAAGACTGTACCAACA	253
maORL1	GGAAGTGCCTCGTCATGTATGTATCCTCAGGCATACCAAGATGAAGACTGTACCAACA	253

mmORL1	TTTACATATTTAATCTGGCACTGGCTGATACCCCTGGTCTTGTCTGACACTGCCCTTCCAG	420
rnORL1	TTTACATATTTAATCTGGCACTGGCTGATACCCCTGGTCTTGTCTGACACTGCCCTTCCAG	313
maORL1	TTTATATATTTAATCTGGCACTGGCTGATACCCCTGGTCTTGTCTGACACTGCCCTTCCAG	313

mmORL1	GCACAGACATCCTTCTGGGCTTCTGGCCATTTGGGAATGCACCTGTGCAAGCGGTCAATG	480
rnORL1	GCACAGACATCCTTCTGGGCTTCTGGCCATTTGGGAATGCACCTGTGCAAGCTGTCAATG	373
maORL1	GCACAGATATCTTATTGGGCTTTGGCCATTTGGGAATGCACATGCAAGACTGTCAATG	373

mmORL1	CTATCGACTACTACAACATGTTTACCAGCACTTTTCACTTTGACTGCCATGAGTGTAGACC	540
rnORL1	CTATCGACTACTACAACATGTTTACCAGCACTTTTCACTTCTGACCCCATGAGCTGTAGACC	433
maORL1	CTATTGACTACTACAACATGTTTACCAGCACTTTTCACTTCTGACTGCCATGAGTGTAGACC	433

mmORL1	GTTATGTAGCTATCTGCCACCCATCCGTGCCTTTGATGTTTCGGACATCCAGTAAAGCCC	600
rnORL1	GCTATGTGGCTATCTGCCACCCATCCGTGCCTTTGATGTTTCGGACATCCAGTAAAGCCC	493
maORL1	GTTATGTGGCCATCTGCCACCCATCCGTGCCTTTGATGTTTCGGACATCCAGTAAAGCCC	493

mmORL1	AGGCCGTTAATGTGGCCATATGGGCCCTGGCTTCGGTGGTGGTGTCTCTGTGCCATCA	660
rnORL1	AGGCCTGTTAATGTGGCCATATGGGCCCTGGCTTCAGTGGTGGTGTCTCTGTGCCATCA	553
maORL1	AGGCTATTAATGTGGCCATATGGGCCCTGGCTTCAGTGGTGGTGTCTCTGTGCCATCA	553

mmORL1	TGGGCTCAGCACAAGTGGAGGATGAAGAGATCGAGTGCCTGGTGGAGATCCCGCCCTC	720
rnORL1	TGGGTTTCCAGCACAAGTGGAGGATGAAGAGATCGAGTGCCTGGTGGAGATCCCGCCCTC	613
maORL1	TGGGCTCAGCACAAGTGGAGGATGAAGAGATCGAATGCCTGGTGGAGATCCCGCCCTC	613

mmORL1	AGGACTATTGGGGCCCTGTATTGCCATCTGCATCTTCTTTTTCCTTCATCATCCCGG	780
rnORL1	AGGACTATTGGGGCCCTGTATTGCCATCTGCATCTTCTTTTTCCTTCATCATCCCTG	673
maORL1	AGGACTACTGGGGCCCGTGTATTGCCATCTGCATCTTCTTTTTCCTTCATCATCCCTG	673

mmORL1	TTCTGATCATCTCTGTCTGCTACAGCCTCATGATTCGACGACTTCTTGGTGTCCGGCTGC	840
rnORL1	TGCTGATCATCTCTGTCTGCTACAGCCTCATGATTCGACGACTTCTTGGTGTCCGGCTGC	733
maORL1	TGCTGATCATCTCTATCTGCTACAGCCTCATGATTCGCGGGCTCCGTGGTGTCCCTCTGC	733

mmORL1	TTTCAGGCTCCCGAGAGAAGGACCGGAACCTGCAGCAGATCACACGGCTGCTAGGTAG	900
rnORL1	TTTCAGGCTCCCGGAGAAGGACCGAAACCTGCAGCAGTATCACTCGACTGGTGGTAG	793
maORL1	TTTCAGGCTCCCGAGAGAAGGACCGGAACCTGCAGCAGTATCACACGGCTGCTAGGTAG	793

mmORL1	TTGTGGCTGTGTTGTGGGCTGTGGACACCTGTGCAGTCTTTGTCTGGTTCAAGGAC	960
rnORL1	TGGTGGCTGTGTTGTGGGCTGTGGACGCTGTGCAGTGTGTTGTCTGGTTCAAGGAC	853
maORL1	TGGTGTCTGTGTTGTGGTCTGTGGACACCGTGAAGTCTTTGTGTGGTCCAGGAC	853

mmORL1	TGGGTGTTTCCAGCAGGTAGTGACTGCAGTAGCCATCTTGCCTTCTGCACAGCCCTGG	1020
rnORL1	TGGGTGTTTCCAGCAGGTAGTGACTGCAGTAGCCATCTTGCCTTCTGCACAGCCCTGG	913
maORL1	TGGGTGTTTCCAGCAGGTAGTGACTGCAGTAGCCATCTTGCCTTCTGCACAGCCCTGG	913

mmORL1	GCTATGTCAACAGTTGTCTCAATCCCATCTCTATGCTTTTCTGGATGAGAAGTCAAGG	1080
rnORL1	GCTATGTCAACAGTTGTCTCAATCCCATCTCTATGCTTTTCTGGATGAGAAGTCAAGG	973
maORL1	GCTATATCAACAGTGTCTCAATCCCATCTCTATGCTTTTCTGGATGAGAAGTCAAGG	973

mmORL1	CCTGCTTTAGAAAGTTCTGCTGTGCTTCTGCCCTGCACCGGAGATGCAGGTTTCTGATC	1140
rnORL1	CCTGCTTTAGAAAGTTCTGCTGTGCTTCTGCCCTGCACCGGAGATGCAGGTTTCTGATC	1033
maORL1	CCTGCTTTAGAAAGTTCTGCTGTGCTTCTGCCCTGCACCGGAGATGCAGGTTTCTGATC	1033

mmORL1	GTGTGCGCAGCATTGCCAAGGATGTGGCCCTTGGTTGCAAGACTCTGAGACAGTACCAC	1200
rnORL1	GTGTGCGCAGCATTGCCAAGGATGTGGCCCTTGGTTGCAAGACTCTGAGACAGTACCAC	1093
maORL1	GTGTGCGCAGCATTGCCAAGGATGTGGCCCTTGGTTGCAAGACTCTGAGACAGTACCAC	1093

mmORL1	GGCCGGCATGACTAGGCGTGGACCTGCCATGGTGCCTGTGAGTACAGAGCCCATCTA	1260
rnORL1	GGCCAGCATGA-----	1104
maORL1	GGCCGGCATGA-----	1104

mmORL1	CACCCAACACGGAGTCTCACACAGTCTACTGCTCTCTAGGTTGACCCCTGAAGTGTGCT	1320
rnORL1	-----	
maORL1	-----	

Figura 9. Comparación de las secuencias nucleotídicas codificantes parciales correspondientes a los transcritos ORL1 caracterizados en distintas especies realizado mediante el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Los asteriscos (*) indican nucleótidos idénticos en todas las especies. Se señalan en amarillo las secuencias de los oligonucleótidos mmORL1-for y mmORL1-rev y la posición en la que se encuentran dentro de la secuencia conservada.

tanto, nosotros podemos concluir que las características funcionales del receptor ORL1 de hámster deben ser similares, a la de otras especies murinas.

Finalmente, como muestra la figura 11B, hemos generado un filograma del receptor ORL1 utilizando el método de “neighbor-joining” (Saitou y Nei, 1987) con el programa MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004). En esta figura se muestran claramente, como hemos indicado anteriormente, los tres grandes clados, desde el grupo más ancestral al más actual, el grupo de peces teleósteos, representado exclusivamente por dos formas génicas de ORL1, el grupo de anfibios junto con la única especie de ave (pollo), y el grupo de mamíferos, con el subclado de especies murinas, donde se localiza el receptor ORL1 de hámster caracterizado en este trabajo.

[A]

	N-terminal	TM1	IL1	TM2	EL1
#maORL	----- --MESLFPAP FWEVLYGSHF EGNLSLLN-- -ETVPHLLL NASHSAFLPL GLKVTIVGLY LAVCIGGLLG NCLVMYVILR				
#ssORL	----- PL Q.....SPN HSLP.P.... .G..... .V.....				
#cfORL	----- L Q.....SPN HSLP.PT... .G..... .V.....				
#hsORL	----- P..... I.....L Q.....SPN HSLP.P.... .G..... .V.....				
#mmORL	----- Q.....-- -.....				
#rnORL	----- Y..... Q.....-- -.....				
#xlORL	----- MDLS.AE.FE AAY.RE.LKN VLSSELSNFY .STGDR... .I....VV. .I.VV.V. .A...V. -Y.....				
#rpORL	----- MDLP.SDAF. QVD.LRELLL N-GSFNDS.F .STGDR...F .VQ....VV. .I.VV.V. .A...V. -Y.....				
#tgORL	----- MDPHFS IPSFEASYLS KLLNDSVVMN LS.L.SGWYF .STSDT... .I.L...IV. .I.VL.V. .A..F.V. -Y.....				
#ggORL	----- MDPLF. AHILEDPLR KLLNDSMMLN LSF.L.SNWFN .GTGDS... SI.I...VV. SI..V.V. .S...V. -F.....				
#zORL1	----- M EFPNDSIGFT DPRHFH.YNE SLFQNNFS-T FNESDS.F.K .F.I..AVV. MI.VV.V.I. -Y.....				
#zORL2	----- MELV .LSYVQQMFN DSRFQGN.SA LDEVDEP.R SA.I...VV. .I.VV.V.I. -Y.....				

	TM3	IL2	TM4	EL2	TM5	IL3
#maORL	ALDYINMFTS TFLTAMSV	RYVAICHPIR	ALDVRTSSKA QAINVAIWA	ASVVGVPVAI MG-SAQVE-D	EEIECLVEIP	APQDYWGPVF AICIFLPSFI
#ssORL	A.....		.V.....	.I.....		.V.....V
#cfORL			.V.....		T.....	.V.....
#hsORL			.V.....		T.....	V...V.V.
#mmORL			.V.....			.V.....
#rnORL			.V.....			.V.....
#xlORL	.M.....	.I.....VK	.I..PH..KV..C..I. .FI.I..MV	..EM..N D.....Q. P.EH..D..	G..V...VT..
#rpORL	.M.....	.I.....VK	.I..PH..KV..C..I. .FI.I..MV	..EMD-S .G...M..QL. D.EH..E..	GS.V.M...VT..
#tgORL	.M.....	.I.....VK	.I..PH..KI..C... .I...MV	..EM..N N.V...Q. V.E..D..	G..V.V...VF..T..
#ggORL	S.....M.....	.I.....K	.I..PH..KV..C... .F.I..AMV	..EN..N N..D..IKL. S.V...D..	G..V...MT..
#zORL1	S.....V...V..M.	.I.....VK	.M..PH..KV..ICV.V. .AI...AMV	L.DVE.DNGE -S...ILVL. D.RS..D..	GT.V..L..L	.A...V..
#zORL2	V...V...V.	.I.V...V.	S.T...PLR. KL...V.V. .A..L.AM.	..QVEK-DDH DGA..M.SL. E.RKH.DR.	MM.V...LV. G..V...S.

	TM6	EL3	TM7	C-terminal
#maORL	LVVVAVFVVC WTPVQVFLV QGLGVQPG--	SEAAVAAILRF	CTALGYINSC LNPILYAFLD	ENFKACFRKF CCASALHREM QVSDRVSIA
#ssORL	.G.....	.T...V...	.V.....	...PTRR...
#cfORL	.G.....	.T...V...	.V.....	...P.R...
#hsORL	.G.....A	.S--	.V.....	...R.DV
#mmORL	.G.....	.T.....	.V.....	...G.....
#rnORL	.G.....	.T.....	.V.....	...S.....
#xlORL	M.....II. .I.I....	.S.AK.D--	.DLK...H. .I...V.S	.V.....K. .FPA.FRP.L
#rpORL	.II. .I.I....	.N.AK.D--	.DVK...L. .I.....S	.V.....K. .FPA.FRP.L
#tgORL	.I. .I.I....	.C.AK.D--	.K.V..H. .I...V.S	...K. .FPA.FRS.L
#ggORL	.II. .I.I....	.C.AKAE--	.LEL..SC.A.S	.V.....K. .FPT.FRT.L
#zORL1	.A....	.I.IMA.A	.S.FNLA--	.VQTF.VFMH. .I...V.S
#zORL2	.S...A.F. .M....LA.I	.A..HVELGA	.QSSM.AMH. .I...A...	.V.....R..HE. .IPANSDFL

[B]

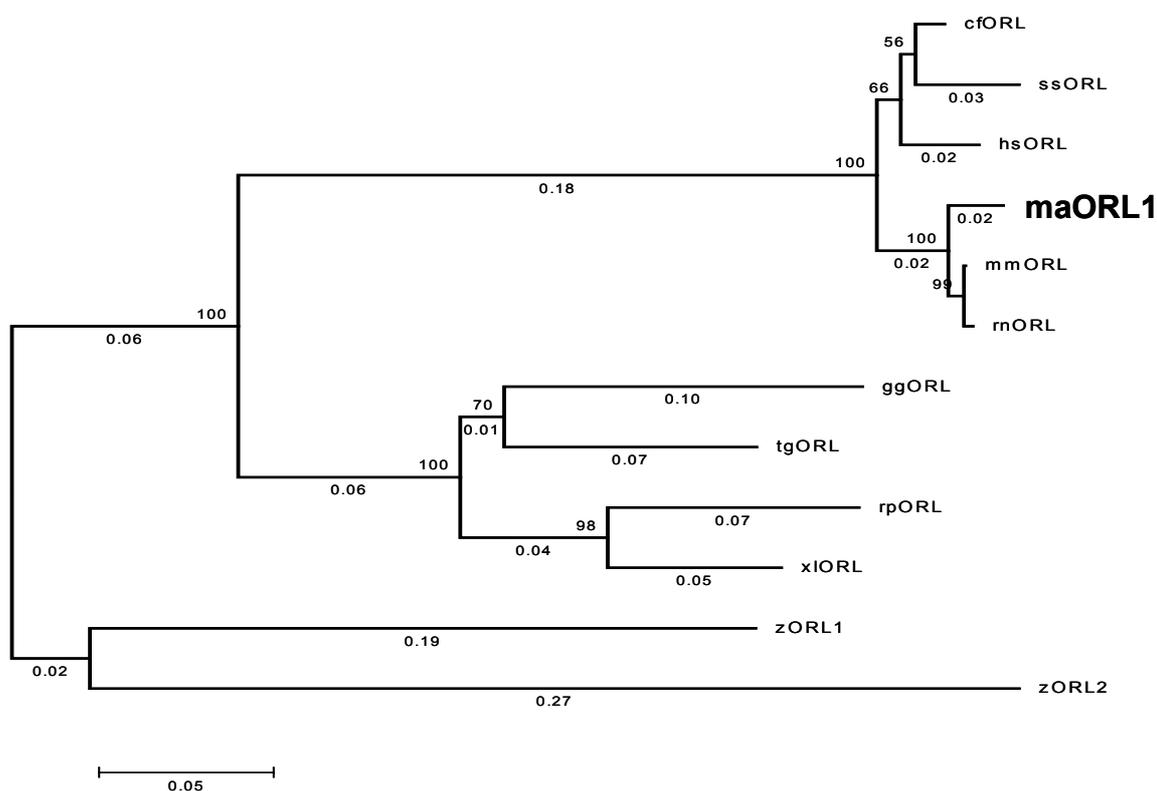


Figura 11. ClustalW [A] y filograma [B] generado mediante el método “neighbour-joining” (programa MEGA3.1, Kumar y col., 2004) al realizar un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de distintos receptores opioides-like (ORL1). Cada uno de los siete dominios transmembrana (TM1-7) se señalan en amarillo, por su parte también se indican el extremo amino-terminal (N-terminal), los tres lazos extracelulares (EL1-3), los tres lazos intracelulares (IL1-3) y el extremo carboxilo-terminal (C-terminal), los puntos indican aminoácidos idénticos en la misma posición observada en la secuencia de maORL y las rayas ausencia de aminoácidos. En el filograma se resalta el receptor ORL1 de hámster (maORL1) caracterizado en este trabajo y el resto de la nomenclatura que se emplea para definir cada receptor ORL1 con su especie es necesario ver la tabla 2. Por su parte, la numeración con decimales representa la distancia entre los distintos nodos y la numeración en cada nodo indica el porcentaje de veces que de 1000 réplicas del agrupamiento las ramas se separan de igual forma.

3. Estudio histoquímico post-crisis en la región troncoencefálica del cerebro de los hámsters GASH/Sal, de la proteína Fos y ORL1.

Para la localización de la expresión de la proteína Fos y el receptor ORL1 fue necesario, un trabajo previo de identificación de los núcleos cerebrales de la región troncoencefálica en los hámsters. En el presente trabajo se cartografiaron los cortes cerebrales obtenidos de hámsters utilizando el patrón de cortes ordenados e histoquímicamente teñidos para visualizar acetil- colinesterasa de Fuentes-Santamaría (2002) (ver anexo 2) y el Atlas estereotáxico de Morin y Wood(2001) para hámsters (ver secciones utilizadas en anexo 1).

Las actividades funcionales del SNC pueden ser mapeadas monitorizando la expresión de genes tempranos como *c-fos*. El gen *c-fos* produce una proteína denominada Fos, la cual actúa como factor de transcripción controlando el paso del ADN a ARNm. Generalmente, la expresión de *c-fos* en las células es muy baja y se activa por un estímulo, por ejemplo un estímulo acústico o un agente estresante (Matsuda y cols.1996). La expresión de *c-fos* ha sido ampliamente utilizada como marcador bioquímico de la actividad neuronal, de modo que un aumento en la expresión de la proteína se entiende como debida a un aumento de las aferencias sobre la población neuronal estudiada. En nuestro caso, quisimos saber si el desencadenamiento de las crisis genera cambios en la expresión de la proteína y por lo tanto detectar las regiones cerebrales con alta actividad neuronal, tras el desarrollo de la crisis inducida en los hámsters GASH:Sal comparándolo con los hámsters control, a los que también se les estimuló con ruido blanco a la misma intensidad acústica, 90 dSPL.

El marcado de la proteína Fos tras la estimulación auditiva por técnicas inmunohistoquímicas, muestra una fuerte presencia de la misma en el núcleo neuronal (Figura 12 y 13), que distingue perfectamente las neuronas que expresan el gen *c-fos* de las que no se expresan.

El cerebro del GASH:Sal, tras el desencadenamiento de las crisis, presenta una fuerte inmunorreactividad para la proteína Fos en todas las subunidades del CI, en la figura 13 vemos el porcentaje de somas inmunopositivos para esta proteína en cada subdivisión del CI del hámster GASH/Sal respecto al control y la distribución

topográfica del marcaje respectivamente. Tras las crisis, también hemos encontrado inmunorreactividad positiva para la proteína Fos en otros núcleos auditivos como el lemmisco lateral o colículo superior pero en menor concentración.

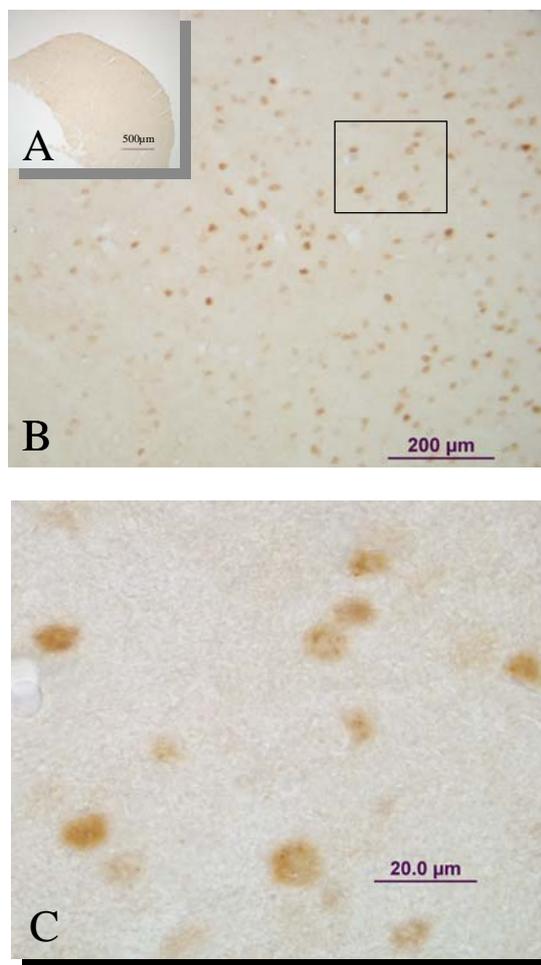


Figura 12: Observación de la proteína Fos. Inmunotinción con anticuerpo sc-52 biotinado en secciones de hámsters. A. Sección coronal del colículo inferior. B y C, detalle a mayor aumento del tejido para visualizar con mayor detalle las neuronas coliculares inmunoteñidas. Nivel interaural: Bregma -6,0 mm.

Los esquemas de los cortes organizados en dirección caudal a rostral, según el Atlas estereotáxico de Lawrence y cols., (2001), muestran una muy alta densidad de expresión de Fos (++++) en las subregiones de la corteza dorsal del Colículo inferior (CDCI) y Corteza del Colículo inferior (CCI), alta densidad en Corteza externa del Colículo inferior (CECI), Núcleo central del Colículo inferior (NCCI) y comisura del Colículo inferior (CCI) (+++). También se observan (figura 14) altas densidades (+++) en la región de la sustancia gris periacueductal (SGP), En el núcleo reticular Pontino, la densidad de expresión de c-fos es ligeramente mayor para los hámsters GASH/Sal comparados con los hámsters control. Por el contrario no se observa ningún marcaje de de la proteína Fos en el Colículo superior de GASH:Sal, mientras para los hámsters control sí se observa expresión de Fos en este núcleo.

Como observamos en los gráficos 1 y 2 , el análisis estadístico comparando entre los núcleos cerebrales de hámsters GASH:Sal con mayor expresión de la proteína Fos y los controles, confirma una diferencia altamente significativa $P \leq 0.01$ para el subnúcleo CECI y para la región SGP. La diferencia entre los subnúcleos CDCI y NCCI es significativa $P \leq 0.05$.

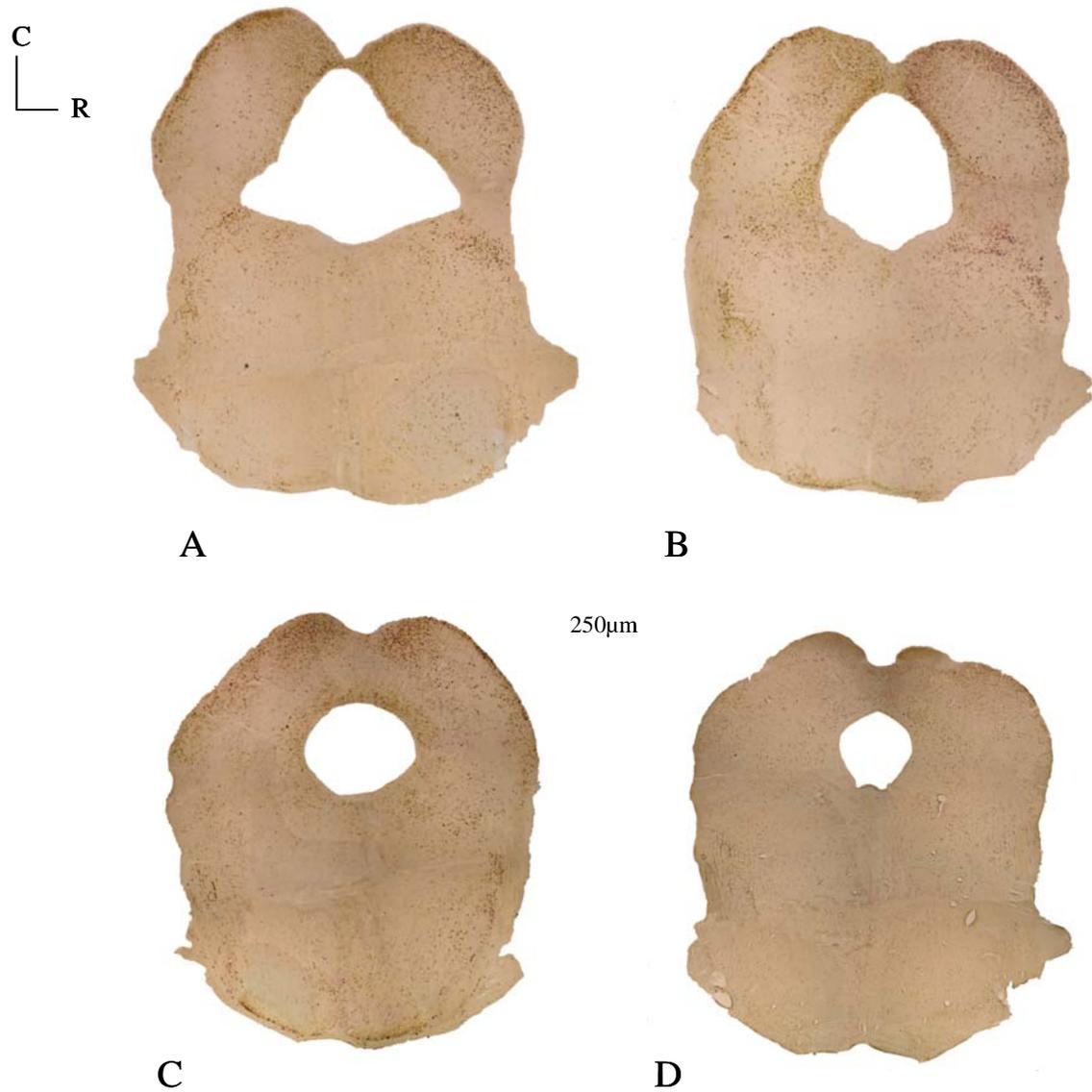


Figura 13: Secciones coronales de hámsters GASH:Sal ordenadas caudo-rostralmente e histoquímicamente procesadas para visualizar proteína Fos, luego de la crisis audigenica. Fotos a 40X.

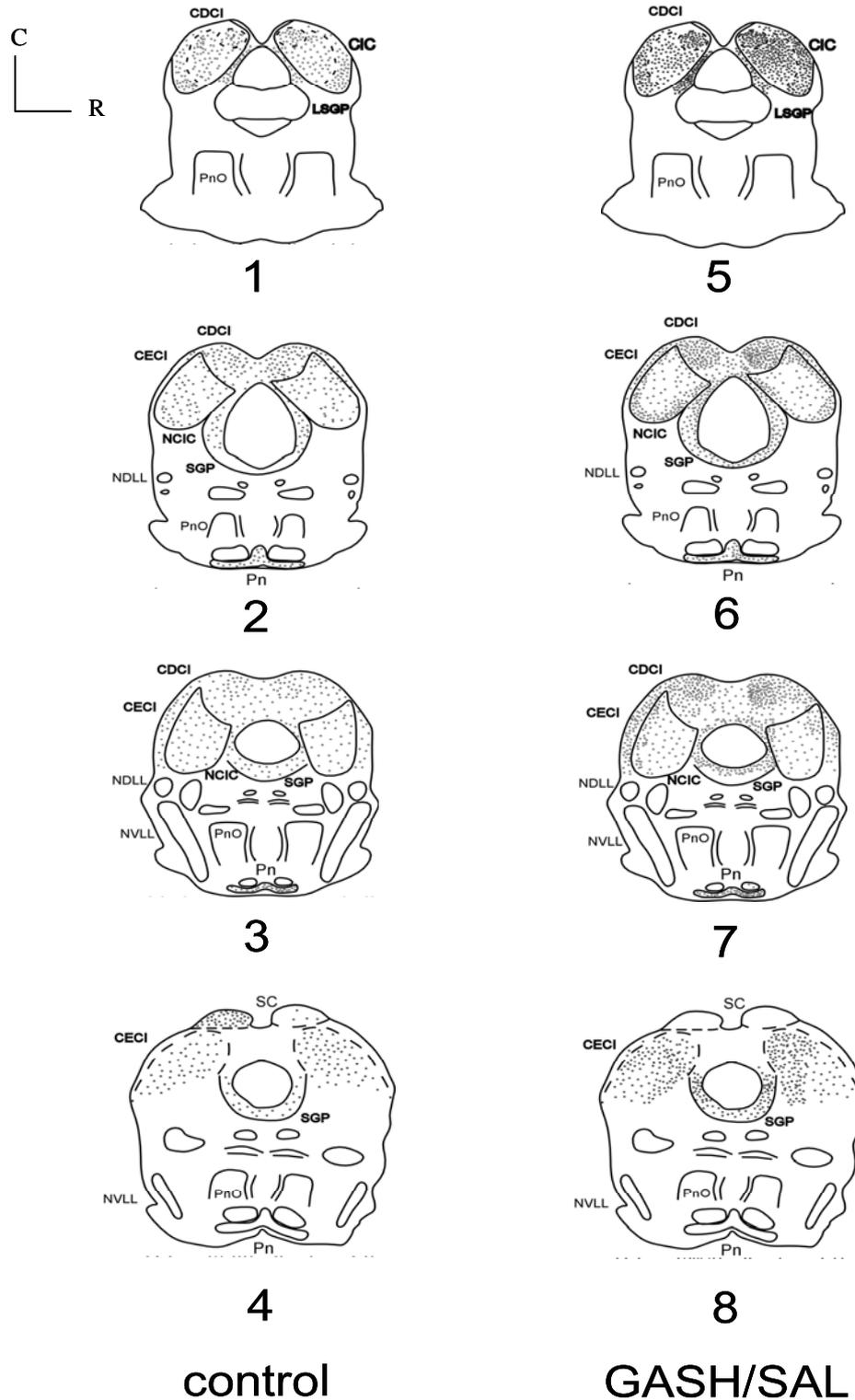


Figura 14: Los esquemas muestran la comparación en expresión y densidad de cortes homólogos entre controles (izquierda) y GASH/Sal (derecha). Los cortes están en dirección del corte mas caudal (arriba) a rostral como indica la flecha. Abreviaturas: Colículo inferior (CI), con los subnúcleos corteza dorsal del Colículo inferior (CDCI), corteza externa del Colículo inferior (CECI), Núcleo central del Colículo inferior (NCCI); región de la sustancia gris periacueductal (SGP), porción lateral de la sustancia gris periacueductal (LSGP); núcleo dorsal del lemnisco lateral (NDLL), núcleo ventral de lemnisco lateral (NVLL), Núcleo reticular oral del puente (PnO), el núcleo del puente (Pn) y la región del Colículo superior. Cada punto que aparece como marcaje representa 10 puntos de los marcajes originales en los cortes estudiados.

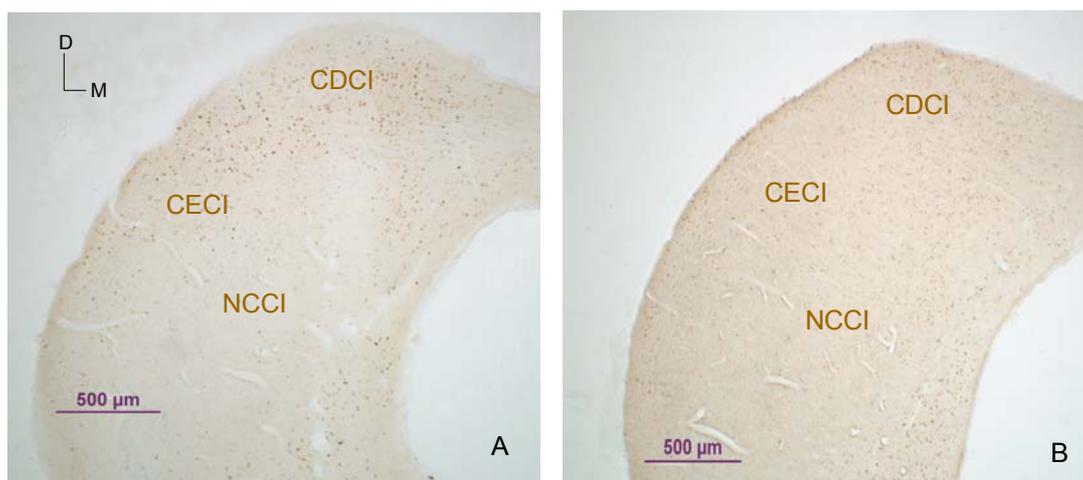


Figura 15: Detalle del CI en los cortes obtenidos luego de la estimulación auditiva. Se observa la densidad de expresión de la proteína Fos para el control (A) y GASH:Sal (B).

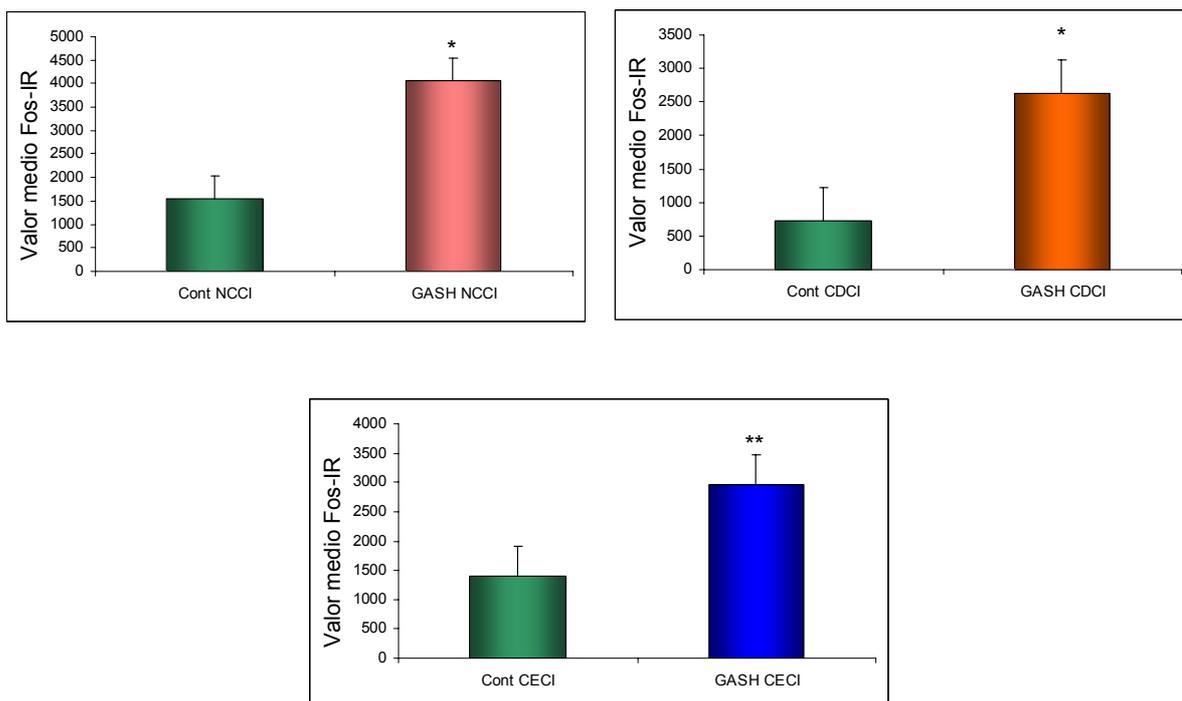


Gráfico 1: En los gráficos se presentan los valores medios y la desviación estándar del número de neuronas inmunorreactivas para el anticuerpo contra c-fos (Fos-IR). En cada gráfico se compara las regiones que presentan mayor expresión de c-fos, entre los controles $n=2$ y los hámsters GASH:Sal $n=2$ para los subnúcleos del CI (CDCI, NCCI, CECI). Los gráficos muestran la media y la desviación estándar para cada grupo, Los datos se muestran con un intervalo de confianza del 95% con nivel de significancia de $P \leq 0.05$ (*) y $P \leq 0.01$ (**).

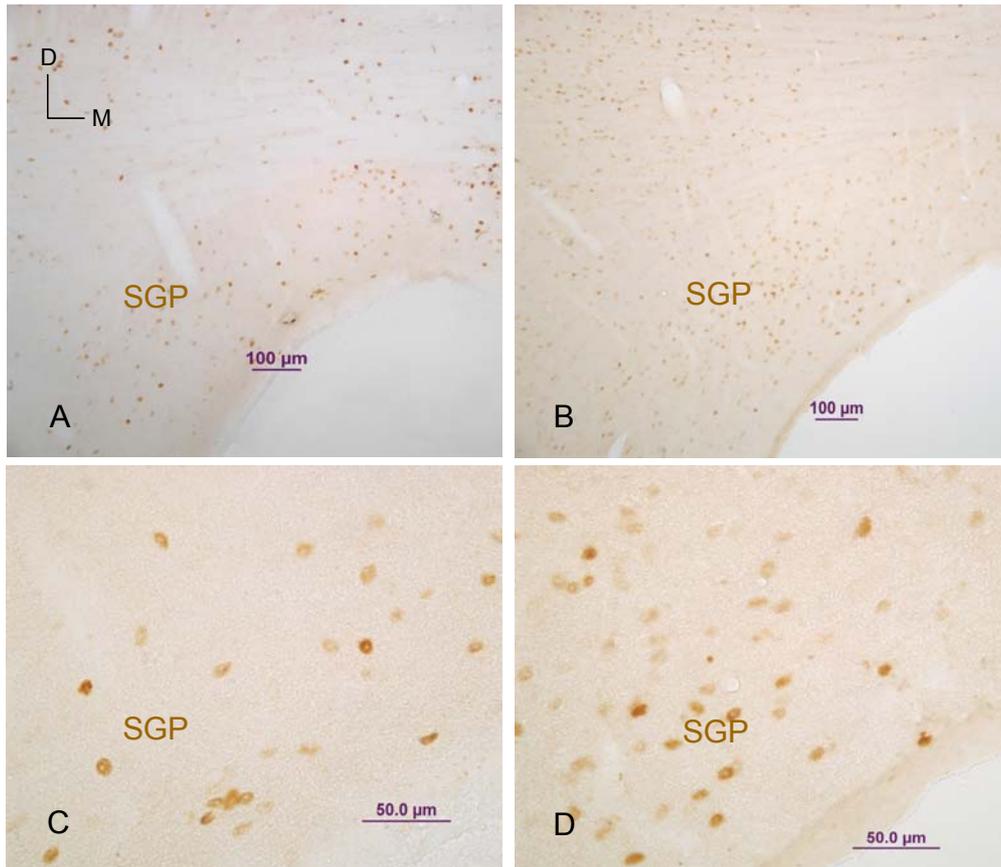


Figura 16: Detalle de la sustancia gris periacueductal (SPG) en los cortes obtenidos luego de la estimulación auditiva. Se observa la densidad de expresión de la proteína Fos para el control (A) y GASH:Sal (B); detalles a mayor aumento de SPG control (C), GASH:Sal (D).

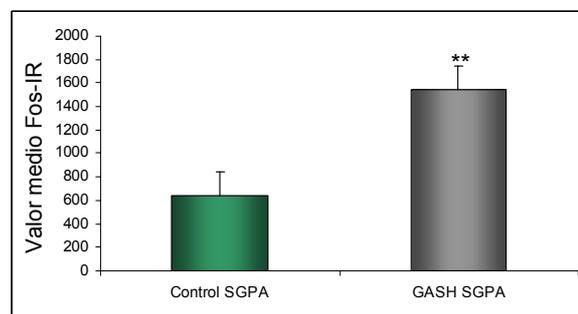


Gráfico 2: En el gráfico se presentan los valores medios del conteo de neuronas que contienen inmunorreactividad al anticuerpo para c-fos (Fos-IR). Se compara la expresión de c-fos para la región SGPA, entre los controles n=2 y los hámsters GASH:Sal n=2. El gráfico muestran la media y la desviación estándar para cada grupo, Los datos se muestran con un intervalo de confianza del 95% con nivel de significancia de $P \leq 0.05$ (*) y $P \leq 0.01$ (**).

El marcado del receptor ORL1 tras la estimulación auditiva con inmunotinción con anticuerpo sc-52 biotinado, muestra difusas marcas en el CI, las cuales son difíciles de determinar y fue necesaria una revisión del tejido a mayores aumentos (figura 17 y 18). Por ello, la visualización de los receptores ORL1 en las neuronas del CI se realizó por técnicas de marcado por inmunofluorescencia. En la figura 17 se observa a gran aumento el marcaje por Cy2 para ORL1 claramente al interior de las neuronas, que se identifica como grumos irregulares con fuerte fluorescencia.

En los animales control no se encontraron neuronas inmunotefñidas para ORL1 en el CI (datos no presentados), a diferencia de lo observado en los cortes obtenidos de hámsters GASH:Sal, después de sufrir la crisis audigénicas. En éstos animales, la inmunorreactividad se localizó exclusivamente en el citoplasma de la célula y raramente aparecía como granos aislados dispersos por el citoplasma, siendo lo más frecuente, observar grumos irregulares con fuerte fluorescencia (figura 17B). Las neuronas marcadas se encontraron también en las mismas regiones del CI, que expresaban alta densidad de la proteína Fos, pero en mucha menor concentración, especialmente en las cortezas dorsal y externa del CI. En la figura 18 se muestra la co-expresión de la proteína Fos y el receptor ORL1 en los cortes de hámsters GASH/Sal tras el desencadenamiento de las CCAs. Se observa como era de esperar, una alta densidad de Inmunorreactividad para la proteína Fos en el CI y en menor medida observamos la co- expresión del receptor ORL1 en un número bajo de neuronas que muestran grumos definidos en los somas, acompañados de una marcaje intenso de la proteína Fos.

El cerebro del GASH:Sal, tras el desencadenamiento de las crisis, presenta una moderada expresión del receptor ORL1 en todas las subunidades del CI. A diferencia de la proteína Fos, es el núcleo central del CI, quien presenta una mayor densidad de neuronas inmunotefñidas para el receptor ORL1 (figura 19). En este núcleo, se observó una mayor densidad de neuronas inmunorreactivas al receptor ORL1, en comparación con las regiones CDCI y CECI del CI (figuras 20).

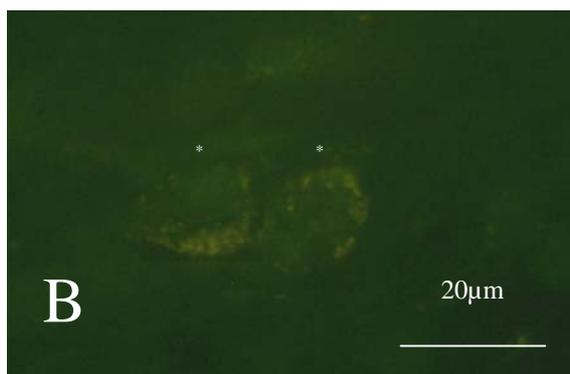
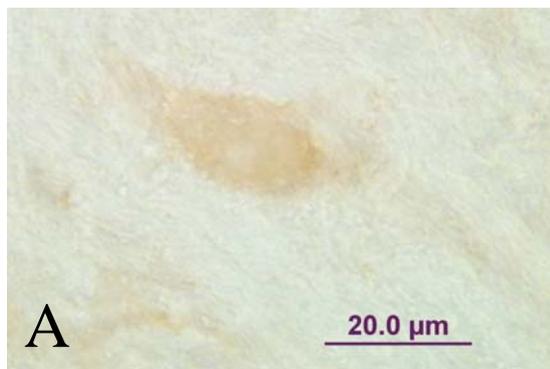


Figura 17: Observación de receptores ORL1. Fotomicrofotografía de neuronas del CI inmunotefidas para visualizar el receptor, empleando anticuerpos marcados con biotina (A) y Cy2 (B).

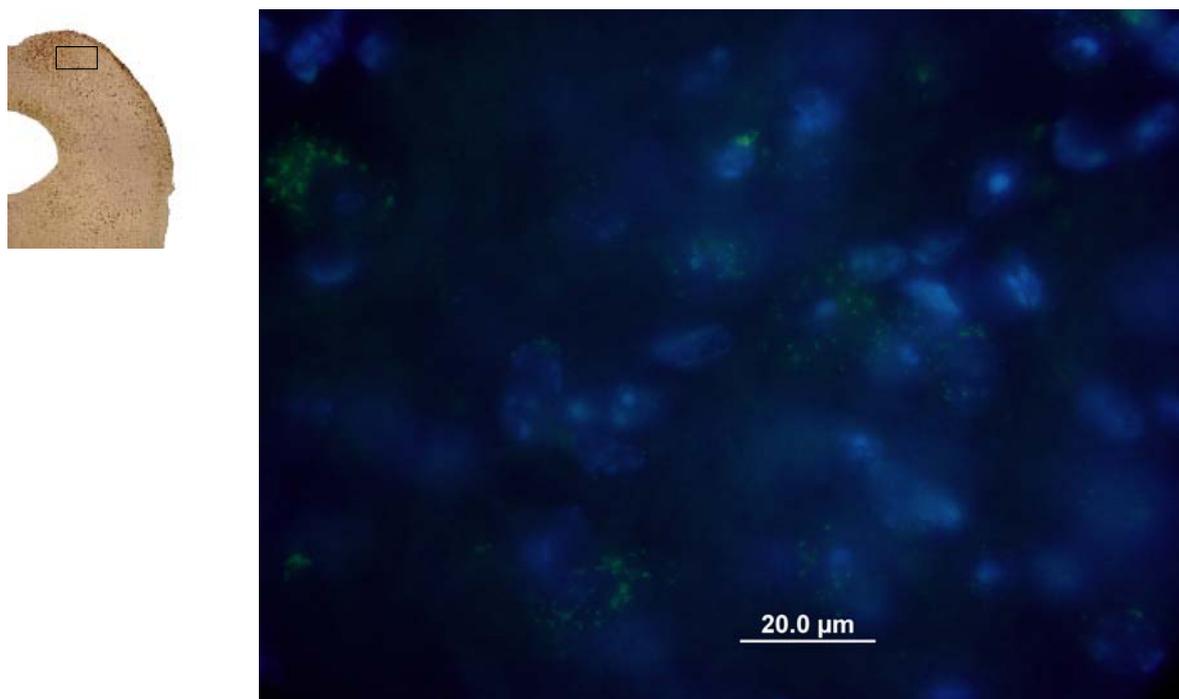


Figura 18: (A) Fotomicrofotografía de la corteza dorsal del CI, donde se muestra la co-localización del receptor ORL1 marcado con Cy2 y la proteína Fos marcado con Cy5. Se observa alta densidad de Fos y bajo marcaje de ORL1. Nivel interaural: Bregma -5,7 mm.

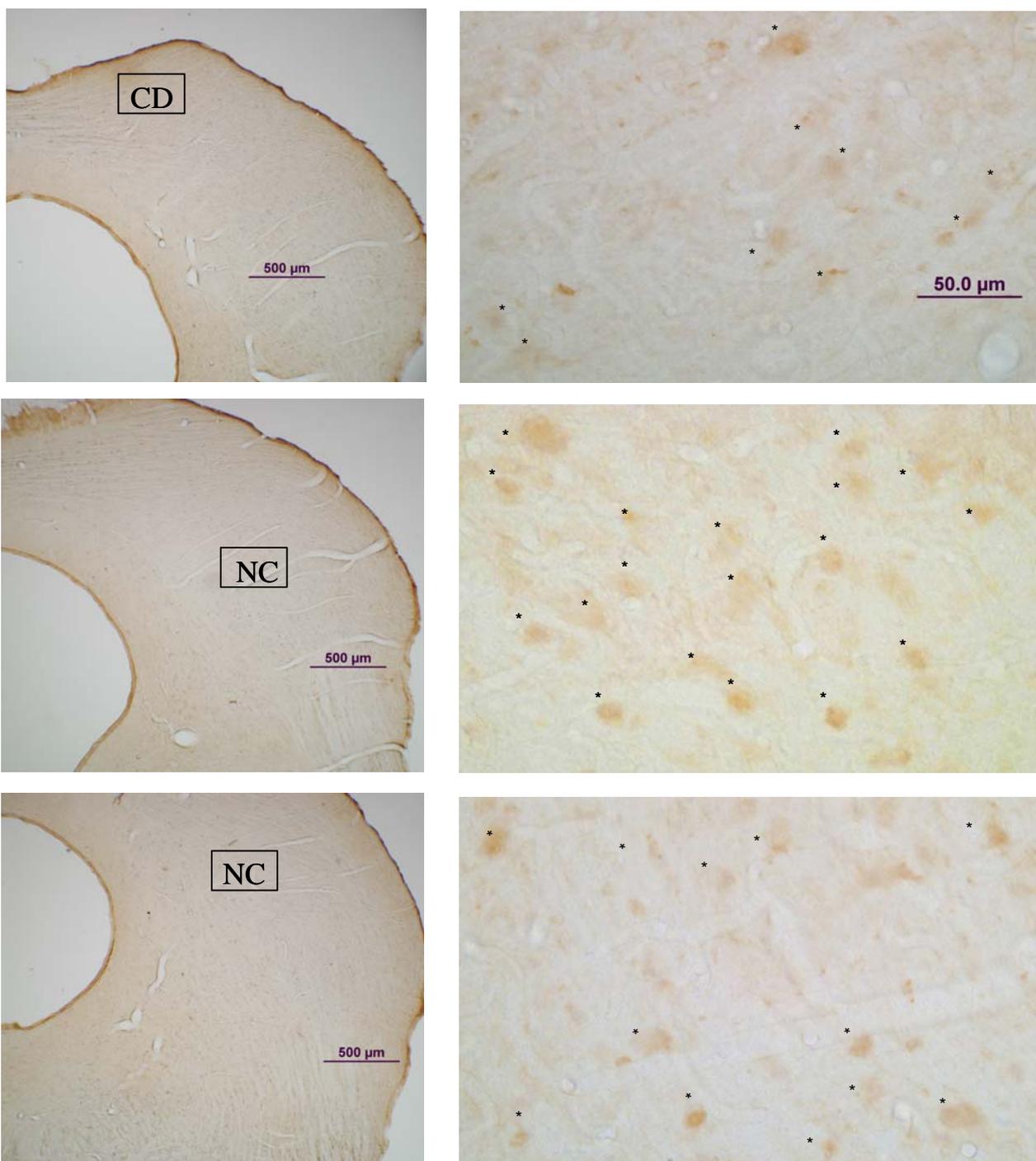


Figura 19: Neuronas inmunorreactivas para ORL1 en el CI de hámsters GASH:Sal. Fotomicrofotografía de neuronas del CI en secciones coronales del cerebro inmunoteñidas para visualizar el receptor empleando anticuerpos biotinados. Fotos (A) (B) (C) niveles interaurales. Fotos (D) (E) (F) fotomicrofotografía a gran aumento para visualizar neuronas marcadas.

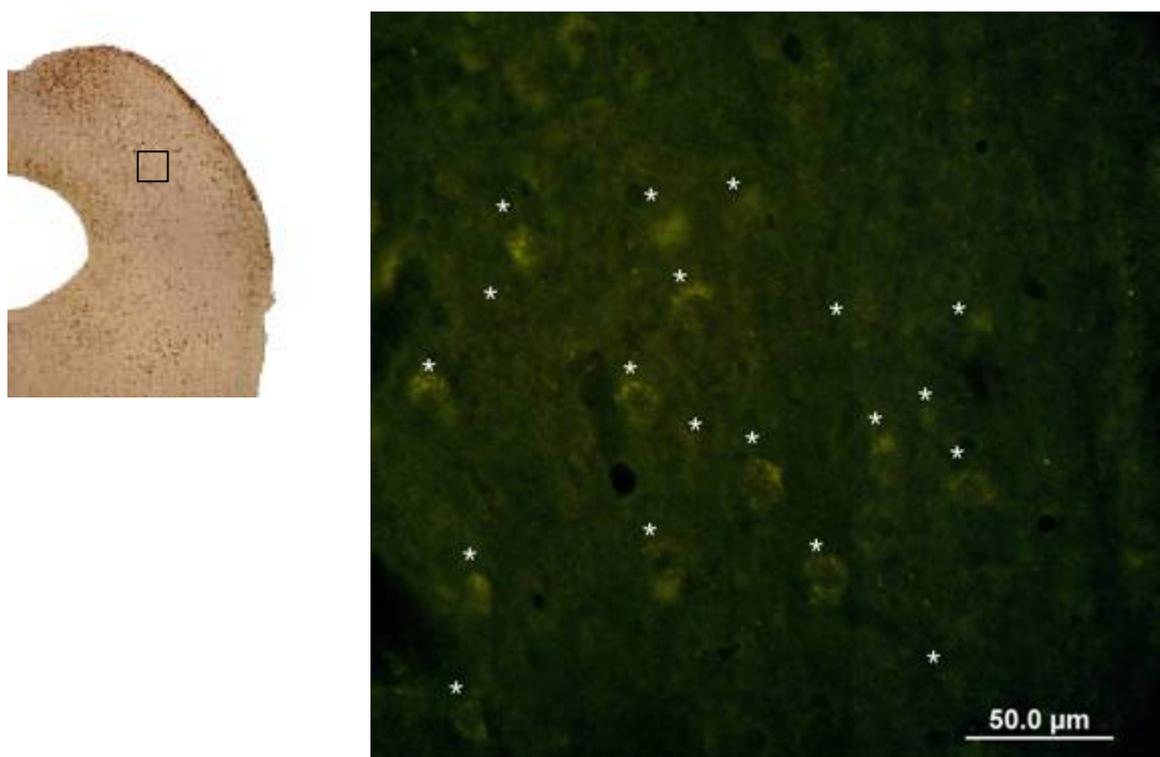


Figura 20: Localización del receptor ORL1. Fotomicrofotografía del NCCI con neuronas inmunoteñidas con anticuerpos contra el receptor ORL1 marcados con Cy2. Nivel interaural: Bregma -5,7 mm.

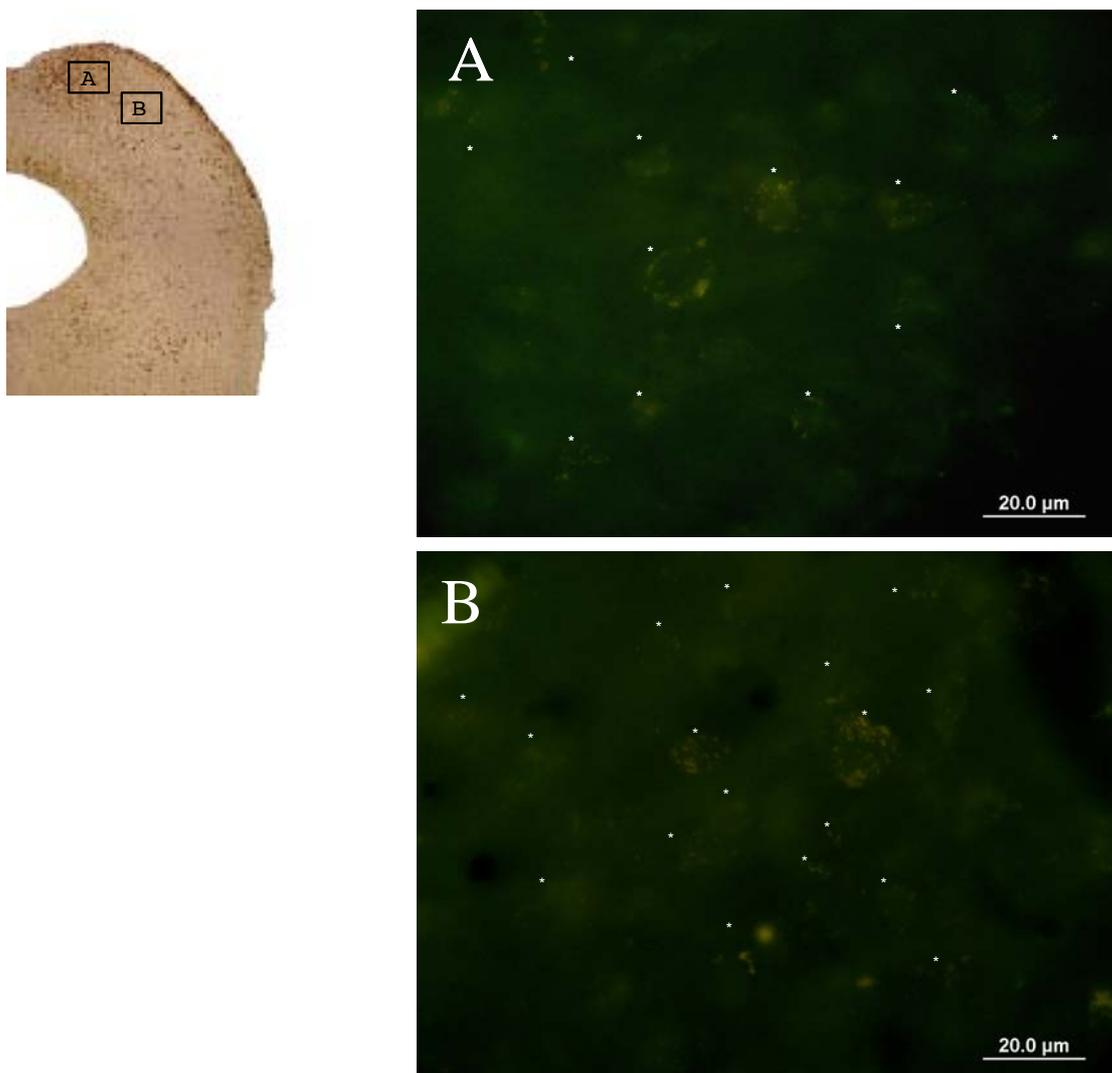


Figura 21: Localización del receptor ORL1. Fotomicrofotografía de la CDCI (A) y región del CEI (B) con neuronas inmunotefidas con anticuerpos contra el receptor ORL1 marcados con Cy2. Nivel interaural: Bregma -5,7 mm.

Discusión

1. Caracterización molecular del receptor ORL1 en los hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*).

Nuestros análisis de expresión por RT-PCR en hámster (*Mesocricetus auratus*) han demostrado la expresión de al menos un transcrito mayoritario en las regiones cerebrales del hipocampo y corteza frontal. El transcrito secuenciado se corresponde con el del receptor tipo opioide para hámster (*Mesocricetus auratus*) que se ha denominado **maORL**. El fragmento encontrado mostró una secuencia de 1104 pb que codifica 367 aminoácidos, siendo el mismo número de residuos aminoacídicos identificados en el receptor ORL1 de rata y ratón y con un peso molecular teórico aproximado de 40.56 kDa.

Como los clásicos receptores opioides (μ , δ , κ) y otros receptores que se acoplan a proteínas G, el receptor ORL1 de hámster al igual que el otros vertebrados (ver resultados Figura 8) posee algunos sitios consenso de ser susceptibles de modificaciones postranscripcionales como son tres residuos de Asn, objeto de N-glicosilación cerca del extremo N-terminal, al igual que la especie humana y la rata (Mollereau y cols., 1994; Wang y cols., 1994); un par de residuos de Cys conservados en los lazos extracelulares 1 y 2 que pueden conectarse mediante la formación de un puente disulfuro lo que conlleva la estabilización de la estructura terciaria del receptor y su implicación en la unión del ligando; y tres residuos de Cys susceptibles de sufrir palmitoilación en el extremo carboxilo terminal formando así un nuevo lazo intracelular (ver resultados, figura 8). Además, en todos los dominios intracelulares se pueden encontrar una serie de residuos Ser, Thr o Tyr (7/2/3) que representan sitios potenciales de ser fosforilados, dependientes tanto de proteín-kinasa A como de proteín-kinasa C, estando fundamentalmente los residuos Ser y Thr involucrados en diversos sistemas de desensibilización (Mollereau y cols., 1994) (ver resultados, figura 8). Asimismo, Wang y colaboradores (2006) han sugerido recientemente que los residuos Ser presentes en el extremo C-terminal, susceptibles también de ser fosforilados, pueden actuar en la desensibilización de este receptor. Se ha sugerido a su vez, que la presencia de distintos residuos Pro dentro de los dominios transmembrana puede desempeñar un papel importante en la función dinámica del receptor. Por un lado, podrían debilitar la estructura de α -hélice de los dominios

transmembrana y, por otro, facilitar el cambio de conformación de éste, posibilitando el balanceo de los dominios transmembrana cuando se produce la unión del ligando o cuando existe asociación o disociación de las proteínas G (Foreman y cols., 1996). Otro grupo de aminoácidos conservados a lo largo de la evolución de las proteínas con siete dominios transmembrana que se acoplan a proteínas G son el residuo Arg localizado al inicio del primer lazo intracelular, residuos polares conservados, como los residuos de Asn en posición 66 y 312, localizados en el primer y séptimo dominio transmembrana respectivamente, y un residuo Asp en la posición 94, dentro del segundo dominio transmembrana. Se considera que estos residuos están implicados en la formación de puentes de hidrógeno en el núcleo del receptor favoreciendo el mantenimiento de la estructura terciaria del mismo (Foreman y cols., 1996).

El receptor ORL1 tiene un origen filogenético temprano y una continuidad funcional durante el curso de la evolución, como se observa en los estudios en especies inferiores: *Rana esculenta* (Benyhe y cols., 1994), el molusco *Lymnaea stagnalis* (Saunders y cols., 2000), los caracoles *Cepaea memoralis* (Kavaliers, 1996) y *Helix aspersa* (Sánchez-Alvarez, 1997).

La secuencia deducida en el presente trabajo, tanto nucleotídica como aminoacídica muestra una homología del 92-93 % y 97-98 % con respecto a las especies, rata y ratón respectivamente, confirmando como indican otros trabajos, que el receptor ORL1 aparece altamente conservado entre las especies de mamíferos (entorno al 90 %).

En un análisis global dominio por dominio de todos los receptores ORL1 caracterizados hasta el momento en distintas especies de vertebrados, se puede apreciar que la mayor homología se sitúa en el primer lazo intracelular y primer lazo extracelular (Figura 11A). Por otra parte, es sabido que el segundo lazo extracelular del receptor ORL1 es importante en la unión de su ligando, la nociceptina; es decir, que es un requerimiento absoluto para la activación del receptor (Meunier y cols., 2000; Mollereau y cols., 1999). Concretamente, atendiendo exclusivamente a la secuencia del segundo lazo extracelular de los distintos receptores ORL1, al igual que cuando analizamos los receptores ORL1 en su conjunto, éstos se pueden agrupar en

tres tipos (ver también en resultados la figura 11B las tres agrupaciones por clados), el de los mamíferos, el de los anfibios junto con el del pollo, y el de peces teleósteos. Se ha demostrado que las cargas negativas en este lazo son esenciales para el establecimiento de la unión del ligando al receptor, el cual podría establecer múltiples contactos con él (Reinscheid y cols., 1996; Dooley y cols., 1997). Específicamente se ha propuesto que la secuencia formada por los residuos Glu-Asp-Glu-Glu de ORL1 de mamíferos es necesaria para estabilizar el receptor en su forma activa cuando el ligando se une a él. No obstante, estos residuos no contribuyen de forma significativa a la unión del agonista *per se* (Moulédous y cols., 2000a). Además, también se postula que el segundo lazo extracelular del receptor ORL1 puede no discriminar en interacciones directas entre aminoácidos, es decir, la posición de estos residuos con carga no sería tan importante, sino que sería mucho más importante el patrón general de atracciones y repulsiones basado en las estructuras secundarias que presenta el segundo lazo extracelular, tanto en el receptor kappa como en el receptor ORL1 (Meng y cols., 1996). De este modo, aun cuando la homología de secuencia aminoacídica en esta zona no es especialmente alta entre los distintos grupos de vertebrados antes indicados, es destacable la similitud de cargas y tipos de aminoácidos (ej: grupo de aminoácidos de Glu y Asp) que permanecen en las distintas especies. Por lo tanto, cabe esperar que lo verdaderamente significativo en la interacción con el ligando sea la cantidad de cargas dentro de este lazo así como su distribución en la estructura secundaria que forme.

Con respecto al tercer lazo extracelular, también podemos diferenciar los mismos tres grupos representativos de los distintos órdenes de vertebrados mencionados anteriormente. Cabe destacar que el residuo N-terminal inmediatamente adyacente al sexto dominio transmembrana (Gln) de todos los receptores ORL1 se encuentra únicamente conservado en este tipo de receptores opioides. Este residuo se ha demostrado que es importante en la activación del receptor más que en la unión de la nociceptina, aunque se ha propuesto que puede tener alguna aportación en la selectividad del ligando por parte del receptor ORL1. Sin embargo, en los receptores kappa y delta de mamíferos, el aminoácido equivalente a este residuo no es importante para la activación, aunque sí tiene una pequeña aportación en la selectividad de los ligandos (Moulédous y cols., 2000b).

Por otra parte, es conocido que en la unión de la nociceptina al receptor ORL1 de algunos mamíferos también desempeña un papel importante el residuo Ile (situado en la posición 300 en el humano y en la posición 297 en las especies murinas). Este residuo puede interaccionar con el aminoácido Ser10 de la nociceptina, permitiendo que los residuos básicos de la nociceptina (Arg8-Lys9 y Arg12-Lys13) se orienten hacia el segundo lazo extracelular del receptor ORL1 humano y establezcan uniones con los residuos ácidos de este lazo (Moulédous y cols., 2000a). Esta Ile se encuentra sustituida por distintos aminoácidos en diferentes grupos de vertebrados: Phe o Ala en algunos teleósteos; y Val en algunos mamíferos; con la excepción del cambio producido con un aminoácido ácido (Phe) en el receptor zfORL1 del pez zebra, lo que podría afectar la unión de la nociceptina a este receptor, los demás cambios no son significativos en cuanto a que todos ellos son aminoácidos alifáticos. Asimismo, Topham y colaboradores (1998), mediante modelaje molecular del receptor ORL1 humano, establecieron que la región N-terminal de la nociceptina (Phe-Gly-Gly-Phe) se une a una región altamente conservada, localizada dentro de los dominios transmembrana de este receptor, en concreto localizada entre las hélices 3, 5, 6, y 7. La homología que presentan estas regiones del receptor ORL1 humano entre las distintas especies de vertebrados es relativamente alta, mayor del 50%, lo cual nos hace suponer que debe poseer el sitio de unión conservado.

En cuanto a los dominios transmembrana de los receptores opioides es conocido que éstos forman en una determinada región el denominado bolsillo de unión del opioide, a través del cual interaccionan de forma específica un determinado ligando con su correspondiente receptor opioide activándolo (Waldhoer y cols., 2004). Concretamente, en el tercer dominio transmembrana del receptores ORL1 y en el de todos los receptores opioides existe un residuo de Asp (en la posición 127 de los receptores ORL1 de ratón y rata) común a todos los vertebrados estudiados hasta el momento. Este residuo, aunque no es imprescindible, sí lo es su carga negativa para la unión de la nociceptina (Moulédous y cols., 2000b; Bröer y cols., 2003). A su vez, el residuo Phe (en la posición 221 de los receptores ORL1 murinos) del quinto dominio transmembrana y también conservado en todos los receptores opioides, es importante en la unión del ligando nociceptina, pues su ausencia produce una total eliminación de esta unión. También, los residuos Tyr128 del tercer dominio transmembrana, Phe217 del quinto dominio transmembrana y Trp273 del sexto dominio transmembrana (todos

ellos localizados en posiciones de receptores ORL1 del orden rodentia y de igual forma conservados en todos los receptores opioides) se encuentran implicados en la unión de la nociceptina y su sustitución da lugar a una reducción de la afinidad por el ligando (Moulédous y cols., 2000b; New y Wong, 2002). A este respecto es muy destacable el hecho de que todos los receptores ORL1 descritos hasta el momento en vertebrados posean todos los residuos aminoacídicos citados, por lo cual podemos postular que absolutamente todos los receptores ORL1 de vertebrados, desde la teóricamente especie teleóstea más ancestral, presentan la propiedad de unirse a la nociceptina. No obstante, la semiconservación de una hendidura hidrofóbica compuesta por las regiones comprendidas entre Gly179-Gly186 en el cuarto dominio transmembrana y Gly209-Ile216 entre el segundo lazo extracelular y el quinto dominio transmembrana (posiciones localizadas en los receptores ORL1 de rata y ratón) (New y Wong, 2002), que interacciona con la Gly6 de la nociceptina, debe matizar la hipótesis anterior. La subregión Gly209-Ile216 entre el segundo lazo extracelular y el quinto dominio transmembrana presenta algunos cambios respecto a especies anfibias, pollo y pez zebra (Asp/Glu/Ser-Val), que podrían interferir en la unión del ligando.

Por último, en nuestros análisis de expresión por RT-PCR en hámster control se ha demostrado la expresión de al menos un transcrito mayoritario (maORL) en las regiones cerebrales hipocampo y corteza frontal. Estos datos son coincidentes con la detección de altos niveles de expresión del receptor ORL1 en el córtex (láminas de la II a la VI de todas las áreas corticales) e hipocampo de mamíferos. Otras regiones cerebrales donde ha sido localizado este gen en otras especies de mamíferos son los núcleos olfatorios anteriores, septum lateral, hipotálamo, amígdala, gris central, núcleos pontinos, núcleos interpedunculares, sustancia nigra, complejo del rafe, locus ceruleus, las crestas dorsal (fundamentalmente de las capas II a IV) y ventral de la médula espinal y los cuerpos celulares de los ganglios de la raíz dorsal. No se ha encontrado expresión en caudado-putamen ni en cerebelo (Mollereau y cols., 1994).

2. Inmunorreactividad de la proteína Fos.

Se ha demostrado que la actividad neuronal plurisináptica puede ser registrada con c-fos, gen perteneciente a la familia de los proto-oncogenes (Hanley, 1988; Herdegen y cols., 1991). Los análisis inmunohistoquímicos de la expresión de la proteína Fos pueden proveer de mapas a nivel celular, de la actividad de las vías funcionales en variadas condiciones patofisiológicas (Ceccatelli y cols., 1989; Uemura y cols., 1991; Chi y cols., 1993; Senba y cols., 1993). En estudios anteriores, se ha considerado que existe una masiva elevación de la expresión de c-fos en regiones cerebrales con alta actividad neuronal, cuando se desencadenan estados convulsivos (Eells y cols., 2004; Eells y cols., 2000; Dragunow y Robertson, 1987; Morgan y Curran, 1991; Simler y cols., 1999).

En nuestro trabajo, pudimos confirmar por medio de la Inmunorreactividad para la proteína Fos, la participación de núcleos cerebrales específicos de la región troncoencefálica involucrados en el desencadenamiento y desarrollo de las crisis audiogénicas en la línea de hámsters GASH:Sal, en nuestro laboratorio se ha demostrado recientemente por medio de registros EEG, que son realmente procesos de tipo epilépticos estas crisis observadas en los hámsters GASH:Sal (Carballosa y cols., *en prensa*). Todos los individuos utilizados experimentalmente de la cepa GASH:Sal mostraron convulsiones tónico-clónicas generalizadas en respuesta a la estimulación sonora, mostrando a su vez, todas las fases comportamentales caracterizadas por Muñoz (2004) y descritas en la metodología.

Se observó que existe una alta densidad de expresión de la proteína Fos en la SGP y en la vía auditiva, especialmente en el CI, en los subnúcleos CDCI y CECI y en menor proporción en la región central (NCCI) y CCI, teniendo valores altamente significativos en referencia a los hámsters control. También en otras regiones troncoencefálicas se observó con altas densidades de marcaje en referencia a los controles, en los núcleos Pn, NCn y NDLL (ver abreviaturas), lo que coincide con los estudios de expresión de c-fos, en animales que han sido sometidos a crisis audiogénicas en ratones C57BL/6J, DBA/2J (Klein y cols., 2004), en ratones DBA/2 (Le Gal La Salle y Naquet, 1990), en ratas propensas genéticamente a padecer crisis

epilépticas (GEPR) (Clough y cols., 1997), en ratas Wistar genéticamente susceptibles a padecer crisis audiogénicas (Simler y cols., 1994) y en ratas Wistar “noise-primed” (Zinder-Keller y Pierson, 1992). En términos generales podemos afirmar, que los núcleos identificados en el troncoencéfalo por Inmunorreactividad de la proteína Fos en los hámsters GASH:Sal, tras el desencadenamiento de crisis audiogénicas, son consistentes con los núcleos que componen la red neuronal implicada en las crisis convulsivas en animales estimulados audiogénicamente descrita por Faingold (1999).

En cuanto a la organización jerárquica de la red neuronal implicada en las CCAs, se ha determinado en múltiples estudios el papel crítico que ejerce en Colículo inferior en el inicio de las CCAs en variadas líneas animales susceptibles a padecer estas crisis (Raisinghani y Faingold, 2003; Ishida y cols., 2002; Browning, 1994; Faingold y Riaz, 1995; Li y cols, 1994; Ribak y Morin, 1995; Sakamoto y Niké, 2001; Zinder-Keller y Pierson, 1992; Yang y cols, 2001). En nuestro caso, los aumentos en la densidad de expresión de la proteína Fos en la vía auditiva se observaron, mayoritariamente en el CI. La Inmunorreactividad para la proteína Fos observada en los subnúcleos CDCI, NCCI, CECI y CCI es coincidente con el papel crítico que presenta estos subnúcleos en el desencadenamiento de las crisis audiogénicas observadas en estudios electrofisiológicos y en particular la muy alta inmunorreactividad que presenta el CECI, subregión del CI que proyecta la salida de los impulsos nerviosos de la vía auditiva hacia los núcleos motores, que ejerce, por tanto, un papel clave en el desencadenamiento de los estados convulsivos en las CCAs (Ribak y cols., 1994; Merrill y cols., 2003; Chakravarty y Faingold, 1997, 1999).

Es importante destacar que aunque fundamentalmente se detectó aumento de la expresión de la proteína Fos en el CI dentro de la vía auditiva, se argumenta según García-Cairasco (2002) que las alteraciones en la región coclear y colicular pueden tener una íntima relación con la predisposición a padecer CCAs, lo cual se ha visto en la línea precedente al desarrollo de la línea de los hámsters GASH:Sal, denominada hámsters GPG/Vall, donde se ha observado anomalías morfológicas y neuroquímicas en la vía auditiva troncoencefálica en especial en el núcleo coclear, complejo olivar superior (COS), núcleo del lemnisco lateral, además CI (Fuentes-Santamaría y cols, 2005), alteraciones que podrían estar afectando en gran medida, la

modulación en la excitabilidad de las neuronas en el CI, ocasionando un desproporcionado aumento en el reclutamiento de las neuronas que evocan respuestas en los subnúcleos del CI cuando se estimula a los hámsters con altas intensidades de ruido blanco. Vale la pena resaltar que en nuestro caso existe un pequeño aumento en el número de células que expresan la proteína Fos en el NLL de los GASH:Sal, debido posiblemente a la hiperexcitabilidad en el CI que puede ejercer influencia por retroalimentación en la vía auditiva dada la alta conectividad entre los núcleos.

Nuestros datos también muestran significativa sobreexpresión del gen *c-fos* en la SGP en los hámsters GASH:Sal, lo que coincide con estudios en otras especies con líneas que presentan CCA, con alta inmunorreactividad a la proteína Fos en la SGP tras presentar crisis audiogénicas, estudios realizados en ratas GEPR-9 (N'Gouemo y Faingold, 1998) y ratones C57BL/6J, DBA/2J (Klein y cols., 2004). La SGP se considera que está implicada en el inicio de las fases clónicas de las CCAs (Yang y cols., 2002; Ishida y cols, 2002; N'Gouemo y Faingold, 1998) y en las fases tónico-clónicas (Faingold, 1999).

El núcleo cuneiforme (NCn), la región Parabraquial lateral porción superior lateral (PLSL) y núcleo del puente (Pn), son otras de las estructuras de la región troncoencefálica que presentaron aumento aunque en menor grado de células con Inmunorreactividad para la proteína Fos. Según Klein y cols. (2004), estas regiones pueden recibir entradas de información directa o indirectamente desde el CECI y manifestar inmunorreactividad de la proteína Fos, inducidas por el desencadenamiento de CCAs. Estas estructuras pueden estar implicadas en las fases tónicas de las convulsiones de origen troncoencefálico (Clough y cols., 1997; Samoriski y cols., 1997).

En resumen, podemos afirmar que la Inmunorreactividad para la proteína Fos observada en los cortes obtenidos en cerebros de hámsters de la cepa GASH:Sal, después de desarrollar CCAs, es muy cercana a lo obtenido en otras especies que presentan estas mismas crisis ante estímulos sonoros. El alto porcentaje de células

nerviosas que presentan inmunorreactividad para las subregiones del CI y la SGP, nos confirma el carácter troncoencefálico de las crisis epilépticas de la línea GASH:Sal y a su vez, el papel crítico que desempeñan estas regiones en las vías nerviosas que se activan en los estados convulsivos generados por estimulación auditiva.

3. Inmunorreactividad del receptor ORL1 en el CI.

Siguiendo el argumento expuesto en la sección anterior, nuestro interés principal fue el poder identificar la presencia del receptor ORL1 en las regiones críticas para el desarrollo de las crisis audiogénicas en la vía auditiva de los hámsters GASH:Sal, identificadas por la sobreexpresión de la proteína Fos. Por lo tanto, hemos centrado el estudio de la expresión de ORL1 en el CI.

Cuando realizamos el marcado de este receptor por técnicas inmunohistoquímicas empleando anticuerpos biotinados, el resultado obtenido fue una pobre definición de la neurona inmunoteñida, debido posiblemente, al pequeño tamaño de la proteína, identificada como ORL1. Por tal motivo el estudio se realizó empleando anticuerpos fluorescentes, que permitieron distinguir inequívocamente entre las neuronas marcadas) y las que no presentaban inmunoreactividad.

Estudiando el comportamiento en ratones KO para el receptor ORL1 Nishi y cols. (1997), concluyen, que el sistema ORL1/Nociceptina es esencial en la regulación de la capacidad auditiva tras la exposición a sonidos. En condiciones normales, el receptor ORL1 en el CI de ratas muestra baja y moderada expresión (Neal y cols., 1999; Letchworth y cols., 2000; Antón y cols., 1996) y en general en los núcleos auditivos troncoencefálicos, no se observa alta expresión del receptor ORL1 (Nishi y cols., 1997; Antón y cols., 1996). Igualmente se observa moderados niveles de expresión de RNAm para nociceptina en CECI y CDCI y baja expresión en NCCI, con altos niveles de expresión en la región troncoencefálica de la vía auditiva en el complejo olivar superior y en el núcleo dorsal del lemnisco lateral (NDLL) (Kakimoto y cols., 2001; Kho y cols., 2006). En relación al CI se ha observado, por el contrario, niveles altos de expresión de nociceptina en cerebros humanos (Witta y cols., 2004).

Es interesante observar que en nuestro estudio, la expresión de ORL1 sólo se observa en los hámsters GASH:Sal tras una fuerte estimulación auditiva, expresión que no es observada en los controles, y, a su vez, esta inmunorreactividad es moderada, coincidiendo con los datos registrados en los estudios descritos en el párrafo anterior para el CI. La mayor presencia del receptor ORL1 en el NCCI a diferencia del CECI y CDCI en los GASH:Sal después del desencadenamiento de las crisis producidas por la estimulación a altos niveles de ruido blanco podría estar relacionada, con la alteración del umbral auditivo en los hámsters y la posible alteración de la organización tonotópica por la hiperexcitabilidad de las neuronas del NCCI, efecto que podría estar siendo corregido por un aumento de la expresión del receptor ORL1 en el periodo de depresión post-ictal, lo que a su vez podría explicar la menor densidad celular de la Inmunorreactividad de la proteína Fos en el NCCI. Estudios con antagonistas del receptor ORL1 muestran disminución de la expresión de la proteína Fos en los núcleos del SNC que están involucrados en el comportamiento de alimentación en ratas (Olszewski y cols., 2000), lo que nos puede indicar que la modulación del receptor ORL1 en las distintas regiones cerebrales podría ser monitoreado con estudios de expresión de la proteína Fos.

4. Implicación del receptor ORL1 en la epilepsia.

Es importante resaltar que el presente estudio es el primero en observar cambios en la expresión del receptor ORL1 en animales que presentan propensión a padecer CCAs, por tanto sólo podemos hacer comparaciones aproximadas con estudios realizados en otros modelos epilépticos.

Recientes estudios en ratas a las que se le generan estados convulsivos progresivos con consecutivas descargas eléctricas en la amígdala, han demostrado que la nociceptina induce efectos pro-convulsivos en convulsiones parciales, mostrando a su vez efectos anticonvulsivos en convulsiones generalizadas (Carmona-Aparicio y cols., 2007). En este estudio, se observaron bajos niveles de expresión de la proteína receptoral ORL1 en los núcleos cercanos a la amígdala en las convulsiones generalizadas, lo que coincide con la baja expresión del receptor en el CI, núcleo que como expusimos anteriormente es el desencadenante de las CCAs. También es interesante observar en este estudio que sólo es posible observar efectos

inducidos por nociceptina a diferentes concentraciones, solamente cuando se generan estados convulsivos consecutivos, lo que podría indicar que el sistema ORL1/nociceptina, solamente es efectivo cuando existen cambios en la capacidad cerebral para limitar o facilitar los estados convulsivos (Carmona-Aparicio y cols., 2007). Podemos argumentar que en los animales genéticamente propensos a padecer CCAs, esta habilidad ya está determinada, por tanto ORL1 puede estar influyendo altamente en la modulación de las crisis audiogénicas.

Otros estudios en los que se emplean modelos animales que presentan crisis generalizadas, han mostrado que altas dosis de nociceptina (i.c.v.), pueden retardar la aparición de estados convulsivos y disminuir la severidad de las crisis (Gutierrez y cols., 2001; Feng y cols., 2004; Rubaj y cols., 2002).

Paradójicamente, en crisis parciales generadas por ácido Kaínico y por electroestimulación consecutiva en amígdala en ratones KO para nociceptina, también se observa un retardo en la aparición de las crisis y una disminución en la severidad de las mismas, en comparación con los controles (Bregola y cols., 2002b). Por el contrario, a altas dosis de nociceptina, las crisis parciales generadas por estimulación eléctrica continua en amígdala de ratas, se suceden antes (Carmona-Aparicio y cols., 2007), lo que nos puede estar confirmando que el sistema ORL1-nociceptina está altamente influenciado por el contexto, es decir, la funcionalidad del sistema depende de la dinámica propia de los circuitos que están implicados en la generación o amplificación de tipos específicos de convulsiones (Carmona-Aparicio y cols., 2004; Feng y cols., 2004)

Carmona-Aparicio y cols. (2004) observaron fuertes incrementos en la expresión de nociceptina en el hipocampo y tálamo en ratones a los que se les ha inducido crisis convulsivas con ácido Kaínico y en contraste se observa disminución de los niveles de m-RNA que codifican el receptor ORL1 en amígdala, hipocampo, tálamo y corteza (Bregola y cols 2002a). En humanos, con epilepsias intratables del lóbulo temporal, se observó que los pacientes que no respondían positivamente a estimulación eléctrica a altas frecuencias presentaban altos niveles del receptor ORL1 en la región del corteza parahipocampal, así como de los receptores Mu y delta, mientras pacientes que respondían adecuadamente al tratamiento, mostraron bajos

niveles de expresión de estos receptores (Rocha y cols., 2007). Los datos descritos anteriormente, nos pueden indicar que la disminución de la severidad de las crisis en algunos estados epilépticos puede estar asociado a un efecto de “down-regulation” del receptor ORL1 debido posiblemente a altos niveles de biosíntesis de nociceptina durante el desarrollo de estas crisis (Bregola y cols., 2002a).

En particular para el estudio de las CCAs, es necesario continuar la vía de investigación empezada, realizando pruebas comportamentales, con agonistas y antagonistas del receptor ORL1, que permitan esclarecer el tipo de modulación del receptor en los núcleos críticos cerebrales que permiten el inicio y desencadenamiento de las crisis. Hasta el momento en la literatura N’Gouemo y Faingold (1999) reportan que microinyecciones focales de opiáceos en el CI pueden, en algunos casos, volver normales a animales susceptibles de padecer CCAs y, a su vez, inyecciones i.c.v. de agonistas opiáceos inducen CCAs en ratas GEPR-9s, observándose un aumento en los niveles de expresión de receptores opioides en ciertas regiones cerebrales. También observan que microinyecciones de naloxona en el CI y en la SGP presentan un inusual retardo en la aparición de las crisis y un prolongado efecto anticonvulsivo, aunque el efecto no bloquea en su totalidad a la crisis. Este efecto se observa también en otros tipos de crisis convulsivas mediadas por antagonistas para el receptor ORL1 (Bregola y cols., 2002b).

Según Clarke y cols., (2001), el aumento de receptores Mu y Kapa en el córtex auditivo observado en ratones KO para el receptor ORL1 que presentan desregulación auditiva, puede indicarnos la relativa interdependencia entre los receptores ORL1 y los clásicos receptores opioides. En futuros estudios es importante esclarecer la relación entre ORL1 y los receptores clásicos opioides en la regulación de las CCAs en el CI y en la SGP. En estudios anteriores se ha sugerido que los ligandos de los receptores Mu pueden modificar la liberación en la neurotransmisión en subpoblaciones de neuronas GABAérgicas en el Colículo inferior (Tongjaroenbungam y cols., 2004 y 2006). Estudios con nociceptina han mostrado modulación de este péptido en la liberación de glutamato y GABA en amígdala de ratas (Meis y Pape, 2001) y modulación de la actividad neuronal en la SGP en estudios *in vitro* (Vaughan y cols, 1997).

En un reciente estudio en los hámsters GPG/Vall con CCAs, se ha observado disminución de los niveles de GABA en el CI, que podría ser un factor clave en el inicio de las crisis (Fuentes-Santamaría y cols., 2008). Estudios futuros podrían centrarse en la relación entre ORL1 y los receptores opióides en la modulación GABA en el CI y la modulación por parte del receptor ORL1 en la SGP, en el modelo GASH:Sal. Estudios que podrían aportar en nuevas estrategias para la modulación de estados epilépticos.

En resumen, podemos decir que la expresión del receptor ORL1, en los núcleos del CI de los hámsters GASH:Sal después de desarrollar CCAs indica un papel modulador del sistema ORL1-nociceptina en el desarrollo de estas crisis epilépticas, con un importante implicación en la modulación de la actividad neuronal en las regiones del CI (NCCI) que reciben las entradas excitatorias de la vía auditiva.

Conclusiones

- 1- Se ha clonado y descrito por vez primera la presencia de un receptor tipo opioide, al que hemos denominado **maORL**, en el sistema nervioso central del hámster, *Mesocricetus auratus*.
- 2- El gen que codifica el receptor **maORL** presenta una secuencia de 1104 pb que codifica 367 aminoácidos y posee un peso molecular teórico aproximado de 40,56 kDa.
- 3- La secuencia deducida en el presente trabajo, tanto nucleotídica como aminoacídica, muestra una homología del 92-93 % y 97-98 %, con respecto a rata y ratón respectivamente, confirmando como indican otros trabajos, que el receptor ORL1 aparece altamente conservado entre las especies de mamíferos.
- 4- Tras el desencadenamiento de crisis convulsivas audiogénicas, los hámsters GASH:Sal presentan una elevada densidad de neuronas inmunorreactivas para la proteína Fos en diversos núcleos troncoencefálicos, especialmente en el colículo inferior en todas sus subdivisiones .
- 5- Se ha encontrado la presencia del receptor ORL1 en las regiones críticas para el desarrollo de las crisis audiogénicas en la vía auditiva de los hámsters GASH/Sal.
- 6- Las neuronas inmunopositivas para el receptor ORL1 se encontraron también en las mismas regiones del colículo inferior que expresaban alta densidad de la proteína Fos, pero en mucha menor concentración, especialmente sus cortezas dorsal y externa.

- 7- A diferencia de la proteína Fos, es la porción auditiva del colículo, el núcleo central, quien presenta una mayor densidad de neuronas inmunoteñidas para el receptor ORL1.
- 8- Todas las neuronas que presentan el receptor ORL1 también coexpresan la proteína Fos, pero sólo una pequeña fracción de las neuronas Fos inmunopositivas expresan el receptor ORL1.
- 9- No se han observado neuronas inmunoteñidas para el receptor ORL1 en el colículo inferior de los animales controles estimulados con sonido.

Bibliografía

Abdulla, F.A., Smith, P.A. (1997). Nociceptin Inhibits T- Type Ca²⁺ Channel current in rat sensory neurons by a G- Protein_ Independent mechanism. *J. Neuroscience*. 17 (22): 8721 – 8728.

Abeles, A. (1991). *Corticronics: Neural circuits of the cerebral cortex.*(Cambridge: Cambridge University Press).

Anton, B., Fein, J., To, T., Li, X., Silberstein, L., Evans, C.J. (1996). Immunohistochemical localization of ORL1 in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurology*. 368: 229 -251.

Avoli, M., D'Antuono, M., Louvel, J., Kohling, R., Biagini, G., Pumain, R., D'Arcangelo, G., Tancredi, V., (2002). Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in Vitro. *Prog. Neurobiol.* 68 (3): 167 – 207.

Bajic, D., Proudfit, H.K. (1999). Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulations of nociception. *J. Comp. Neurol.* 405 (3): 359 -379.

Benyhe, S., Monory, K., Farkas, J., Toth, G., Guerrini, R., Salvadori, S., Orosz, G., Wollemann, M., Borsodi, A. (1999). Nociceptin binding sites in frog (*Rana esculenta*) brain membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 260(3): 592 – 596.

Bertram, E.H., Mangan, P.S., Zhang, D., Scott, C.A., Williamson, J.M. (2001). The midline thalamus: alterations and a potential role in limbic epilepsy. *Epilepsia*. 42 (8): 967 – 978.

Binaschi, A., Zucchini, S., Bregola, G., Rodi, D., Mazzuferi, M., Reinscheid R. K., Simonato, M. (2003). Delayed epileptogenesis in nociceptin/orphanin FQ- deficient mice. *Neuroreport*. 14(6): 825- 827.

Bregola, G., Zucchini, S., Rodi, D., Binaschi, A., D'Addario, C., Landuzzi, D., Reinscheid, R.K., Candeletti, S., Romualdi, P., Simonato, M. (2002a). Involvement of the Neuropeptide Nociceptin/Orphanin FQ in Kainate Seizures. *J Neurosci*. 22(22): 10030- 10038.

Bregola, G., Zucchini, S., Frigati, L., Candeletti, S., Romualdi, P., Reinscheid, R., Simonato, M. (2002b). Involvement of Neuropeptide Orphanin FQ/Nociceptin in Kainate and Kindling seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*. 43 (5): 18 – 19.

Bröer, B.M., Gurrath, M., Holtje, H.D. (2003) Molecular modelling studies on the ORL1-receptor and ORL1-agonists. *J Comput Aided Mol Des* 17(11): 739-54.

Browning, R.A. (1994). Anatomy of generalized convulsive seizures. In: Malafosse, A., Genten P., Hirsch, E., Marescaux, C., Broglin, D., Bernasconi, R. (Eds), *Idiopathic Generalized Epilepsies: Clinical, Experimental and Genetic Aspects*. Libbey, London, pp. 399-413.

Bruno, R.M., and Sakmann, B. (2006). Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science*. 312: 1622 – 1627.

Bunzow, J.R., Sáez, C., Mortrud, M., Bouvier, C., Williams, J.T., Low, M., Grandy, D.K. (1994). 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: 284-288.

Caló, G., Rizzi, A., Marzola, G., Guerrini, R., Salvadori, S., Beani, L., Regoli, D., Bianchi, C. (1998). Pharmacological characterization of the nociceptin receptor mediating hyperalgesia in the mouse tail withdrawal assay. *Br J Pharmacol* 125: 373–378.

Candeletti, S., Ferri, S. (2000). Effects of an antisense oligonucleotide to pronociceptin and long-term prevention of morphine actions by nociceptin. *Peptides*. 21: 1119- 1124.

Carlen, P.L., Skinner, F., Zhang, L., Naus, C., Kushnir, M., Perez-Velazquez, J.L. (2000). The role of gap junctions in seizures. *Brain Res. Rev.* 32: 235 – 241.

Carballosa, M.M., Muñoz-Pascua, L., García-Cairasco, N., López, D.E. EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster strain GASH:Sal. *Epilepsia* (*en prensa*).

Carmona-Aparicio, L., Candeletti, S., Binaschi, A., Mazzuferi, M., Mantovani, S., Di Benedetto, M., Lopetuso, G., Romualdi, P., Simonato, M. (2004). Kainate seizures increase nociceptin/orphanin FQ release in the rat hippocampus and thalamus: a microdialysis study. *J. Neurochemistry*. 91: 30 – 37.

Carmona-Aparicio, L., Peña, F., Borsodi, A., Rocha. (2007). Effects of nociceptin on the spread and seizures activity in the rat amygdala kindling model: Their correlations with ³H-leucyl-nociceptin binding. *Epilepsy Res.* 77: 75-84.

Ceccatelli, S., Villar, M.J., Goldstein, M. and Hkfelt, T. (1989). Expression of c-fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (&: 9569 – 9573.

Chakravarty, D.N., Faingold, C.L. (1997). Aberrant neuronal responsiveness in the genetically epilepsy- prone rat: acoustic responses and influences of the central nucleus upon the external nucleus of inferior colliculus. *Brain Res.* 761(2): 263 – 270.

Chakravarty, D.N., Faingold, C.L. (1999). Differential roles in the neuronal network for audiogenic seizures are observed among the inferior colliculus subnuclei and the amygdale. *Exp. Neurol.* 157(1). 135-141.

Chen, C.S., Gates, G.R. (1976). Effect of morphine and nalaxone on priming-induced audiogenic seizures in BALB/c mice. *J. Pharmac.* 58: 517 – 520.

Chen, Y., Fan, Y., Liu, J., Mestek, A., Tian, M., Kozak, C.A., 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.

Chi, S.I., Levine, J.D., Basbaum, A.I. (1993). Effects of injury discharge on the persistent expression of spinal cord fos-like immunoreactivity produced by sciatic nerve transaction in the rat. *Brain Res.*, 617: 220 – 224.

Chomczynsky y Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

Clarke, S., Chen, Z., Hsu, M.S., Pintar, J., Hill, R. Kitchen, I. (2001) Quantitative autoradiographic mapping of the ORL1, μ - δ - and κ -receptors in the brains of knockout mice lacking the ORL1 receptor gene. *Brain Res.* 906: 13-24.

Clough, R.W., Eells, J.B., Browning, R.A., Jobe, P.C. (1997). Seizures and proto-oncogene expression of fos in the brain of adult genetically epilepsy-prone rats. *Exp. Neurol.* 146, 341-353.

Contreras. D. (2000) Modelos experimentales en epilepsia. *Revista de Neurología.* Vol 30 (4): 370 – 376.

Covo, P.C. (2006). John Hughlings Jackson, un científico victoriano. *Ac. Neurol. Colomb.* 22: 257 – 260.

Cruz-Campos, G., (1998). Concept and historical evolution in epilepsy in pre-columbian and vigerency Peru. *Rev. Neurol.* 27 (159): 862 – 866.

Dickenson, A.H. (1996). Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive nerve fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord. *Neuroreport* 7: 1341.

Dooley, C.T., Spaeth, C.G., Berzetei-Gurske, I.P., Craymer, K., Adapam I.D., Brandtm S.R., Houghten, R.A., Toll, L. (1997) Binding and in vitro activities of peptides with high affinity for the nociceptin/orphanin FQ receptor, ORL1. *J Pharmacol Exp Ther.* 283(2):735-41.

Douglass, J., Grimes, L., Shook, J., Lee, P.H., Hong, J.S. (1991) Systemic administration of kainic acid differentially regulates the levels of prodynorphin and proenkephalin mRNA and peptides in the rat hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 9: 79 – 86.

Dragunow, M., Robertson, H.A. (1987). Generalized seizures induce c-fos protein(s) in mammalian neurons. *Neurosci. Lett.* 82(2): 157 – 161.

Dudek, F.E., Patrylo, P.R., Wuarin, J.P. (1999). Mechanisms of neuronal synchronization during epileptiform activity. *Adv. Neurol.* 79: 699 – 708.

Dumas de la Roque, A., Oppenheim, C., Chassoux, F., Rodrigo, S., Beuvon, F., Daumas-Duport, C., Devaux, B., Meder, J.F. (2005). Difussion tensor imaging of partial intractable epilepsy. *Eur. Radiol.* 15: 279 – 285.

Dutra Moraes, M.F., Galvis-Alonso, O.Y., Garcia-Cairasco, N. (2000). Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Res.* 39(3): 251 – 259.

Eells, J.B., Clough, R.W., Miller, J.W., Jobe, P.C., Browning, R.A. (2000): Fos expression and 2-deoxyglucose uptake following seizures in developing genetically epilepsy-prone rats. *Brain Res. Bull.* 52 (5): 379 – 389.

Eells, J.B., Clough, R.W., Browning, R.A., Jobe, P.C. (2004). Comparative fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentynetetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats. *Neuroscience.* 123(1): 279-292.

Elferink, J.G. (1999). Epilepsy and its treatment in the ancient cultures of America. *Epilepsia.* 40 (7): 1041 – 1046.

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

Faingold, C.L., Riaz, A. (1994). Increased responsiveness of pontine reticular formation neurons associated with audiogenic seizure susceptibility. *Exp. Neurol.* 132: 91 – 98.

Faingold, C.L., Riaz, A. (1994). Ethanol withdrawal induces increased firing in inferior colliculus neurons associated with audiogenic seizure susceptibility. *Exp. Neurol.* 132: 91-98.

Faingold, C.L., Randall, M.E. (1995). Pontine reticular formation neurons exhibit a premature and precipitous increase in acoustic responses prior to audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Brain Res.* 704: 218 – 226.

Faingold, C.L. (1999). Neuronal networks in the genetically epilepsy- prone rat. *Adv. Neurol.* 79: 311 – 321.

Faingold, C.L., Randall, M.E. (1999). Neurons in the deep layers of superior colliculus play a critical role in the neuronal network for audiogenic seizures: mechanisms for production of wild running behaviour. *Brain Res.* 815: 250 – 258.

Faingold, C. L. (2004). Emergent properties of CNS neuronal networks as targets for pharmacology: application to anticonvulsant drug action. *Prog Neurobiol.*, 72: 55- 85.

Feng, H.J., Naritoku, D.K., Randall, M.E., Faingold, C.L. (2001). Modulation of audiogenically kindled seizures by gamma-aminobutyric acid- related mechanisms in the amygdala. *Exp Neurol.* 172 (2): 477 – 481.

Feng, Y., Chao, D.M., Li, W.M., Cao, Y.X., Wang, Y.Q., Wu, G.C. (2004). Inhibition of nociceptin/orphanin FQ on penicillin-induced seizures in rat. *Brain Research.* 1020: 214 – 219.

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

Florin, S., Leblond, F., Suaudeau, C., Meunier, J.-C., Costentin, J. (1999). Comparison of behavioural effects of NocII or NocIII, two related pronociceptin-derived peptides. *Life Sci* 65: 2727–2733.

Foreman, J.C., Johansen, T. (1996). Text book of receptor pharmacology. CRC Press. London: 66-84.

Freeman, W.J. (1986). Petit mal seizure spikes in olfactory bulb and cortex caused by runaway inhibition after exhaustion of excitation. *Brain Res. Rev.* 11: 259 – 284.

Freeman, W.J. (1993). The Emergence of chaotic dynamics as a basis for comprehending intentionality in experimental subjects. K.H. Pribram 8ed) *Rethinking Neural Networks. Quantum Fields & Biological Data.* Hillsdale, N.J., Lawrence Erlbaum & Associates, pp. 507 – 514.

Fries, P. (2005). A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn. Sci.* 9: 474 – 480.

Fukuda K., Kato S., Mori K., Nishi, M., Takeshima, H. (1993). Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta and mu subtypes. *FEBS Lett.* 327(3): 311-314.

Fuentes-Santamaría, V., Cantos, R., Alvarado, J.C., García-Atarés, N., López, D.E. (2005). Morphologic and neurochemical abnormalities in the auditory brainstem of the genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsia.* 46: 1027 – 1045.

Fuentes-Santamaría, V., Alvarado, J.C., Herranz, A.S., García-Atarés, N., López, D.E. (2007). Morphologic and neurochemical alterations in the superior colliculus of the genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Res.* 75: 206 – 219.

Fuentes-Santamaría, V., Alvarado, J.C., Herranz A.S., García-Atarés N., López, D.E. (2008). Decreased levels of GABA in the inferior colliculus of the epilepsy-prone Hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Res.* (en prensa).

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

Gall, C., Lauterborn, J., Isackson, P., White, J. (1990). Seizures neuropeptide regulation, and mRNA expression in hippocampus. *Prog. Brain Res.* 83: 371 – 390.

Gambardella, A., Manna, I., Labate, A., Chifari, R., Serra, P., La Russa, A., LePiane, E., Cittadella, R., Andreoli, V., Sasanelli, F., Zappia, M., Aguglia, U., Quattrone, A. (2003). Prodynorphin gene promoter polymorphism and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 44: 1255 – 1256.

Garcia-Cairasco, N., Sabbatini, R.M.E. (1991). Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in Wistar rats. *Physiol. Behav.* 50: 421 – 427.

Garcia- Cairasco, N., Doretto, M.C., Prado, R.P., Jorge, B.P.D., Terra, V.C., Oliveira, J.A.C. (1992). New insights into behavioural evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods. *Behav Brain Res.* 48: 49 – 56.

Garcia- Cairasco, N., Oliveira, J.A.C., Wakamatsu, H., Bueno, S.T.B., Guimaraes, F.S. (1998). Reduced exploratory activity of audiogenic seizure susceptible Wistar rats. *Physiol. Behav.* 64: 671 – 674.

Garcia-Cairasco, N. (2002). A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic- motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hearing Res.* 168: 208 – 222.

Gavioli, E.C., Marzola, G., Guerrini, R., Bertorelli, R., Zucchini, S., DeLima, T.C., Rae, G.A., Salvadori, S., Regoli, D., Calo, G. (2003). Blockade of nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor signaling produces antidepressant-like effects: pharmacological and genetic evidences from the Mouse forced swimming test. *Eur. J. Neuroscience.* 17: 1987 – 1990.

Gigout, s., Louvel, J., Kawasaki, H., D'Antuono, M., Armand, V., Kurcewicz, I., Olivier, A., Laschet, J., Turak, B., Devaux, B., Pumain, R., Abolí, M. (2006). Effects of gap junction blockers on human neocortical synchronization. *Neurobiology of Disease* 22: 496 – 508.

Gil-Verona, J. A., Gómez, P., Macías, J. García-Atarés, N. (1991). Comportamiento morfológico de la porción troncoencefálica del sistema acústico en hámsters que padecen epilepsia audiógena. *Rev. Esp. Epilepsia*, 6: 85- 95.

Gil-Verona, J. A., Martín, J., García-Atarés, N., Pastro, J. F., Gómez, P., Macías, J. (1993). Estudio del efecto de la estimulación repetida sobre la presentación clínica de las crisis epilépticas audiógenas del hámster GPG/Vall. *Rev. Neurofisiol. Clínica.* 6-2: 69- 72.

Gonzalez, L.P., Czachura, J.F., Berwer, K.W. (1989). Spontaneous versus elicited seizures following ethanol withdrawal: differential time course. *Alcohol.* 6(6): 481 – 487.

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

Gorji, A. (2001). History of epilepsy in medieval Iranian medicine. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 151 (15 – 17): 397 – 402.

Gulyas-Kovacs, A., Doczi, J., Tarnawa, I., Detari, L., Banczerowski-Pelyhe, I., Vilagi, I. (2002). Comparison of spontaneous and evoked epileptiform activity in three in Vitro epilepsy models. *Brain Res.* 945 (2): 174 – 180.

Gutierrez, R., Leff, P., Romo-Parra, H., Acevedo, R., Antón, B. (2001). Orphanin-FQ/Nociceptin inhibits kindling epileptogenesis and enhances hippocampal feed-forward inhibition. *Neuroscience.* Vol 105 (2): 325 – 333.

Halford, W.P., Gebhardt, B.M., Carr, D.J.J. (1995). Functional role and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor. *J Neuroimmunol.* 59(1-2): 91-101.

Hammers, A., Asselin, M.C., Hinz, R., Kitchen, I., Brooks, D.J., Duncan, J.S., Koeppe, M. J. (2007). Upregulation of opioid receptor binding following spontaneous epileptic seizures. *Brain.* 130: 1009 – 1016.

Hanley, M.R. (1988). Proto-oncogenes in the nervous system. *Neuron,* 1: 175 – 182.

Herdegen, T., Kovary, K., Leak, J., Bravo, R. (1991). Specific temporal and spatial distribution of JUN, Fos, and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *J. Comp. Neurol.,* 313: 178 – 191.

Hong, J.S. (1992). Hippocampal opioid peptides and seizures. *Epilepsy Res. Suppl.* 7: 187 – 195.

Houtani, T., Nishi, M., Takeshima, H., Sato, K., Sakuma, S., Kakimoto, S., Ueyama, T., Noda, T., Sugimoto, T. (2000). Distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor protein and receptor in brain and spinal cord: a study using in situ hybridization and X-gal histochemistry in receptor-deficient mice. *J Comp Neurol* 424: 489–508.

Hunt, S.P., Pini, A., Evan, G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature.* 328(6131): 632 – 634.

Huxtable, R., Laird, H. (1978). The prolonged anticonvulsant action of taurine on genetically determined seizure- susceptibility. *Can. J. Neurol. Sci.,* 5(2): 215- 221.

ILAE.(1981). Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 22: 489- 501.

ILAE (1989). Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 30: 389- 399.

Ishida, Y., Nakahara, D., Hashiguchi, H., Nakamura, M., Ebihara, K., Takeda, R., Nishimori, T., Niké, H. (2002). Fos expresión in GABAergic cells and cells immunopositive for NMDA receptors in the inferior and superior colliculi following audiogenic seizures in rats. *Synapse*. 46 (2): 100 – 107.

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

Jenck, F., Wichmann, J., Dautzenberg, F.M., Moreau, j.L., Ouagazzal, A.M., Martin, J.R., Lundstrom, K., Cesura, A.M., Poli, S.M., Roever, S., Kolczewski, S., Adam, G., Kilpatrick, G. (2000). A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: Anxiolytic profile in the rat. *PNAS*. Vol 97(9): 4938 – 4943.

Kakimoto, S., Houtani, T., Sato, K., Ueyama, T., Sakuma, S., Munemoto, Y., Ohishi, H., Kase, M., Yamashita, T., Takeshima, H., Sugimoto, T. (2001). Brainstem auditory regions in mice expression of nociceptin/orphanin FQ precursor mRNA in selected neurons. *Neuroscience Letters*. 314: 37 – 40.

Kamei, J., Matsunawa, Y., Miyata, S., Tanaka, S.I., Saitoh, A. (2004). Effects of nociceptin on the exploratory behaviour of mice in the hole- board test. *Eur. J. Pharmacology*. 489: 72 – 87.

Kanamatsu, T., Obie, J., Grimes, I., McGinty, J:F., Yoshikawa, K., Sabol, S., Hong, J.S. (1986). Kainic acid alters the metabolism of Met5-enkephalin and the level of dynorphin A in the rat hippocampus. *J. Neuroscience*. 6: 3094 – 3102.

Kavaliers, M., Perrot-Sinal, S. (1996). Pronociceptive effects of the neuropeptide nociceptin in the land snail *Cepaea nemoralis*. *Peptides*. 17(5): 763 – 768.

Khalilov, I., Le Van Quyen, M., Gozlan, H., Ben-Ari, Y. (2005). Epileptogenic actions of GABA and fast oscillations in the developing hippocampus. *Neuron* 48: 787 – 796.

Kho, S.T., Lopez, I.A., Evans, C., Ishiyama, A., Ishiyama, G. (2006). Immunolocalization of orphanin FQ in rat cochlea. *Brain Res.* 1113: 146 – 152.

Klein, B.D., Fu, Y.H., Ptacek, L.J., White, H.S. (2004). c-fos immunohistochemical mapping of the audiogenic seizure network and tonotopic neuronal hyperexcitability in the inferior colliculus of the frinds mouse. *Epilepsy Res.* 62: 13-25.

Köster, A., Montkowski, A., Schulz, S., Stube, E.M., Knautd, K., Jenck, F., Moreau, J.L., Nothacker, H.P., Civelli, O., Reinscheid, R.K. (1999). Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18): 10444-10449.

Krushinsky, L.V., Molodkina, L.N., Fless, D.A., Dobrokhotova, L.P., Steshenko, A.P., Semiokhina, A.F., Zorina, Z.A., Romanova, L.G. (1970). The functional state of the brain during sonic stimulation. Whelch B.L., Welch A.S. editors. *Physiological effects of noise*, New York: Plenum Press, 151 – 158.

Kuhar, M.J., Pert, C.B., Snyder, S.H. (1973). Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* 245: 447-451.

Kumar, S., Takuma, K., Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 2004 Jun;5(2):150-63.

Kummer, W. y Fischer, A. (1997). Nociceptin and its receptor in guinea-pig sympathetic ganglia. *Neurosci Lett* **234**: 35–38.

Kuzmin, A., Sandin, J., Terenius, L., Ögren, S.O. (2004). Evidence in locomotion test for the funcional heterogeneity of ORL1 receptors. *Brit. J. Pharmacology.* 141: 132 – 140.

Labiner, D.M., Butler, L.S., Cao, Z., Hosford, D.A., Shin, C., McNamara, J.O. (1993). Induction of c-fos mRNA by Kindled seizures: complex relationship with neuronal burst firing. *J. Neuroscience*. 13(2): 744 – 751.

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

LeGal la Salle, G., Naquet, R. (1990). Audiogenic seizures evoked in DBA/2 mice induce c-fos oncogene expression into subcortical auditory nuclei. *Brain Res*. 518, 308-312.

Le Van Quyen, M., Navarro, V., Martinerie, J., Baulac, M., Varela, F.J. (2003). Towards a neurodynamical understanding of ictogenesis. *Epilepsia* 44 (Suppl 12): 30 – 43.

Letchworth, S.R., Mathis, J.P., Rossi, G.C., Bodnar, R.J., Pasternak, G.W. (2000). Autoradiographic localization of ¹²⁵I-[Tyr₁₄]orphanin FQ/nociceptin and ¹²⁵I-[Tyr₁₀]orphanin FQ/nociceptin(1–11) binding sites in rat brain. *J Comp Neurol* 423: 319–329.

Leumann, L., Sterchi, D., Vollenweider, F., Ludewig, K., Fruh, H. (2001). A neural network approach to the acoustic startle reflex and prepulse inhibition. *Brain Res. Bull*. 56 (2): 101 – 110.

Levitt, P. (2005). Disruption of interneuron development. *Epilepsia* 46 (Suppl 7), 22 – 28.

Li, Y., Evans, M.S., Faingold, C.L. (1994). Inferior colliculus neuronal membrane and synaptic properties in genetically epilepsy-prone rats. *Brain Res*. 660 (2), 232-240.

Liu, E.H., Lee, T.L., Nishiuchi, Y., Kimura, T., Tachibana, S. (2007). Nocistatin and its derivatives antagonize the impairment of short-term acquisition induced by nociceptin. *Neuroscience Lett*. 416: 155 – 159.

Llinás, R.R, Jahnsen H. (1982) Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in Vitro. *Nature* 297: 406 – 408.

Loacker, S., Sayyan, M., Wittmann, W., Herzog, H., Schwarzer, C. (2007). Endogenous dynorphin in epileptogenesis and epilepsy: anticonvulsant net effect via kappa opioid receptors. *Brain*. 8: 1 – 12.

Locock, C. (1857). Discussion of a paper by EH Sieveking analyses of 52 cases of epilepsy observed by the autor. *Lancet*. 1: 527.

Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J., Kosterlitz, H.W. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-499.

Lund, M. (1997). Does bromide cause conversion of epilepsy to psychosis?. *J. Hist. Neurosci.* 6 (1): 61 – 71.

Madar, I., Lesser, R.P., Krauss, G., Zubieta, J. K., Lever, J.R., Zinder, C.M., Ravert, H.T., Musachio, J.L., Mathews, W.B., Dannals, R.F., Frost J.J. (1997). Imaging of δ and μ - opioide receptors in temporal lobe epilepsy by positron emission tomography. *Ann . Neurol.* 41 (3): 358 – 367.

Mamiya, T., Noda, Y., Nishi, M., Takeshima, H., Nabeshima, T. (1998). Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor- Knockout mice. *Brain Research.* 783: 236 – 240.

Mamiya, T., Noda, Y., Nishi, M., Takeshima, H., Nabeshima, T. (1999). Nociceptin system plays a role in the memory retention: involvement of nalaxone benzoylhydrazone binding sites. *Neuro Report.* 10: 1171 – 1175.

Manabe, T., Noda, Y., Mamiya, T., Katagiri, H., Houtani, T., Nishi, M., Noda, T., Takahashi, T., Sugimoto, T., Nabeshima, T., Takwshima, H. (1998). Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature.* Vol 394: 577 – 580.

Mansour, A., Doyle, R., Katz, R., Valenstein, E.S. (1981). Long-Lasting changes in morphine sensitivity following amygdaloid kindling in mice. *Physiology & Behavior.* Vol 27: 1117 – 1120.

Marescaux, C., Vergnes, M., Kiesmann, M., Depaulis, A., Micheletti, G., Warter, J.M. (1987). Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. *Exp. Neurol.* 97 (1): 60 – 68.

Marrosu, F. Santoni, F., Fa, M., Puligheddu, M., Barberini, L., Genugu, F., Frau, R., Manunta, M., and Mereu, G. (2006). Beta and gamma range EEG power-spectrum correlation with spiking discharges in DBA/2J mice absence model: role of GABA receptors. *Epilepsia* 47: 489 – 494.

Mathis, J.P., Rossi, G.C., Pellegrino, M.J., Jimenez, C., Pasternak, G.W., Allen, R.G. (2001) Carboxyl terminal peptides derived from prepro-orphanin FQ/nociceptin (ppOFQ/N) are produced in the hypothalamus and possess analgesic bioactivities. *Brain Res*, 895: 89-94.

Meis, S., Pape, H. C. (2001). Control of glutamate and GABA release by nociceptin/orphanin FQ in the rat lateral amygdala. *J of Physiology.* 532(2): 701-712.

Meloni, E.G., Davis, M. (2000). GABA in the deep layers of the superior colliculus/mesencephalic reticular formation mediates the enhancement of startle by the dopamine D1 receptor agonist SKF 82958 in rats. *J. Neurosci.* 20 (14): 5374 – 5381.

Meng, F., Taylor, L.P., Hoversten, M.T., Ueda, Y., Ardati, A., Reinscheid, R.K., Monsma, F.J., Watson, S.J., Civelli, O., Akil, H. (1996). Moving from the orphanin FQ receptor to an opioid receptor using four point mutations. *J Biol Chem.* 271(50):32016-32020.

Merkouris, M., Dragatsis, I., Megaritis, G., Konidakis, G., Zioudrou, C., Milligan, G., Georgoussi, Z. (1996). Identification of the critical domains of the μ -opioid receptor involved in G-protein coupling using site-specific synthetic peptides. *Mol. Pharmacol.* 50: 985-993.

Merrill, M.A., Clough, R.W., Jobe, P.C., Browning, R.A. (2003). Role of the superior colliculus and the intercollicular nucleus in the brainstem seizure circuitry of the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsia.* 44(3): 305 – 314.

Meunier, J.C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., Monsarrat, 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.

Meunier, J.C. (1997) Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur. J. Pharm.* 340: 1-15.

Meunier, J.C., Mouledous, L., Topham, C.M. (2000) The nociceptin (ORL1) receptor: molecular cloning and functional architecture. *Peptides*. 21:893-900.

Millan, M.H., Meldrum, B.S., Faingold, C.L. (1986). Induction of audiogenic seizure susceptibility by focal infusion of excitant amino acid or bicuculline into the inferior colliculus of normal rats. *Exp. Neurol.* 91 (3): 634 – 639.

Mitsuma, T., Rhue, N., Kayama, M., Adachi, K., Mori, Y., Nogimori, T., Sakai, J., Ping, J., Hirooka, Y. (1998). Distribution of orphanin FQ in the rat - an immunohistochemical study. *Med Sci Res* 26: 403–405.

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

Mollereau, C., Mouledous, L., Lapalu, S., Cambois, G., Moisand, C., Butour, J.L., Meunier, J.C. (1999). Distinct mechanisms for activation of the opioid receptor-like 1 and kappa-opioid receptors by nociceptin and dynorphin A. *Mol Pharmacol.* 55(2):324-31.

Morgan, J.I., Curran, T. (1991). Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* 12(9): 343-349.

Morin, L.P., Wood, R.I. (2001). A stereotaxic Atlas of the Golden Hamster Brain. Academia Press.

Moulédous, L., Topham, C.M., Mazarguil, H., Meunier, J.C. (2000a). Direct identification of a peptide binding region in the opioid receptor-like 1 receptor by

photoaffinity labelling with [Bpa(10), Tyr(14)]nociceptin. *J Biol Chem* 275: 29268–29274.

Moulédous L, Topham CM, Moisand C, Mollereau C, Meunier JC. (2000b). Functional inactivation of the nociceptin receptor by alanine substitution of glutamine 286 at the C terminus of transmembrane segment VI: evidence from a site-directed mutagenesis study of the ORL1 receptor transmembrane-binding domain. *Mol Pharmacol.* 57(3): 495-502.

Mouton, L.J., Holstege, G. (1994). The periaqueductal gray in the cat projects to lamina VIII and the medial part of lamina VII throughout the length of the spinal cord. *Exp. Brain Res.* 101 (2): 253 – 264.

Muñoz, L. (2004). Establecimiento y caracterización de una línea de hámsters sirios propensos a padecer convulsiones audiógenas. Tesis Doctoral, Univ. de Salamanca.

N'Gouemo, P., Faingold, C.L. (1998). Periaqueductal gray neurons exhibit increased responsiveness associated with audiogenic seizures in the genetically epilepsy- prone rat. *Neuroscience.* 84: 619 – 625.

N'Gouemo, P., Faingold, C.L. (1999). The periaqueductal grey is a critical site in the neuronal network for audiogenic seizures: modulation by GABA_A NMDA and opioid receptors. *Epilepsy Research.* 35: 39 – 46.

Nabeshima, T., Noda, Y., Mamiya, T. (1999)- The role of nociceptin in cognition. *Brain Research.* 848: 167 – 173.

Nagai, J., Kurokawa, M., Takeshima, H., Kieffer, B.L., Ueda, H. (2007). Circadian-dependent learning and memory enhancement in nociceptin receptor (NOP)- deficient mice with a novel KUROBOX apparatus using stress- free positive cue task. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321 (1): 195 – 2001.

Naritoku, D.K., Mecozzi, L.B., Aiello, M.T., Faingold, C.L. (1992). Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy- prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviours. *Exp. Neurol.* 115: 317 – 324.

Neal, C.R., Mansour, A., Reinscheid, R., Nothacker, H.P., Civelli, O., Akil, H., Watson, S.J. (1999a). Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with [125I]-[14Tyr]-orphanin FQ binding. *J Comp Neurol* 412: 563–605.

Neal, C.R., Mansour, A., Reinscheid, R., Nothacker, H.P., Civelli, O., Watson, S.J. (1999b). Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 406: 503–547.

New, D.C. Wong, Y.H. (2002) The ORL₁ receptor: Molecular Pharmacology and signalling Mechanisms. *Neurosignals*. 11: 197-212.

Nishi, M., Takeshima H., Mori M., Nakagawara K. Takeuchi T. (1994) Structure and chromosomal mapping of genes for the mouse kappa-opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 1353-1357.

Nishi, M., Houtani, T., Noda, Y., Mamiya, T., Sato, K., Doi, T., Kuno, J., Takeshima, H., Nubada, T., Nabeshima, T., Yamashita, T., Noda, T., Sugimoto, T. (1997). Unrestrained nociceptive response and disregulation of hearing ability in mice lacking the nociceptin/orphaninFQ receptor. *The EMBO Journal*. Vol16(8): 1858 – 1864.

Noda, M., Teranishi, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Notake, M., Nakanishi, S., Numa, S. (1982). Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. *Nature* 297: 431-434.

Norden, A.D., Blumenfeld, H. (2002). The role of subcortical structures in human epilepsy. *Epilepsia Behav.* 3: 219 – 231.

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

O'Donnell, A.M., Ellis, L.M., Riedl, M.S., Elde, R.P., Mawe, G.M. (2001). Distribution and chemical coding of orphanin FQ/nociceptin- immunoreactive neurons in the myenteric plexus of guinea pig intestines and sphincter of Oddi. *J Comp Neurol* 430: 1–11.

Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., Tachibana, S., Yoshihara, Y., Nishiuchi, Y., Kimura, T., Ito, S. (1998). Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. *Nature* 392:286–289.

Okuda-Ashitaka, E., y Ito, S. (2000). Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. *Peptides* 21: 1101–1109.

Olszewski P.K., Grace, M.K., Billington, C.J., Levine, A.S. (2000). The effect [Phe¹Ψ (CH₂ –NH)Gly²]-nociceptin(1-13)NH₂ on feeding and c-fos immunoreactivity in selected brain sites. *Brain Res.* 876: 95-102.

Osinski,M.A., Pampusch,M.S., Murtaugh,M.P. y Brown,D.R. (1999) Cloning, expression and functional role of a nociceptin/orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract *Eur. J. Pharmacol.* 365 (2-3), 281-289

Palacios, L. (2000). Breve historia de la electroencefalografía. *Acta.Neurol.Colomb.* Vol 18 (2): 104-107.

Pan, Y.X., Xu, J., Pasternak G.W. (1996) Structure and characterization of the gene encoding a mouse kappa₃- related opioid receptor. *Gene* 171: 255-260.

Pan, Y-X., Xu, J., Wan, B.L., Zuckerman, A., Pasternak, G.W. (1998). Identification and differential regional expression of KOR-3/ORL-1 gene splice variants in mouse brain. *FEBS Lett* 435: 65–68.

Pan, Z.Z. (1998). μ- Opposing actions of the κ- opioid receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 19 (3): 94 – 98.

Peluso, J., LaForge, K.S., Matthes, H.W., Kreek, M.J., Kieffer, B.L., Gaveriaux-Ruff, C. (1998). Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J Neuroimmunol* 81: 184–192.

Pert, C.B., Snyder, S.H. (1973). Opiate receptors: its demonstration in nervous tissue. *Science.* 179: 1011-1014.

Pierce, J.P., Kurucz, O.S., Milner, T.A. (1999). Morphometry of a peptidergic transmitter system: dynorphin B-like immunoreactivity in the rat hippocampal mossy fiber pathway before and after seizures. *Hippocampus*. 9: 255 – 276.

Prasad, A., Williamson, J. M., Bertram, E. H. (2002). Phenobarbital and MK- 801, but not phenytoin, improve the long- term outcome of status epilepticus. *Am Neurol* 51: 175 – 181.

Pretel, S., Applegate, C.D., Piekut, D.T. (1995). Seizure-induced activation of Enkephalin and Somatostatin-synthesizing Neurons. *Peptides*. Vol 16(5): 951 – 957.

Raisinghani, M., Faingold, C.L. (2003). Identification of the requisite brain sites in the neuronal network subserving generalized clonic audiogénica seizures. *Brain Res*. 967(1-2): 113-122.

Raisinghani, M., Feng, H.J., Faingold, C.L. (2003). Glutamatergic activation of the amygdala differentially mimics the effects of audiogenic seizure kindling in two sub-strains of genetically epilepsy- prone rats. *Exp. Neurol*. 183(2): 516 – 522.

Raisinghani, M., Faingold, C.L. (2005a). Neurons in the amygdala play an important role in the neuronal network mediating a clonic form of audiogenic seizures both before and after audiogenic kindling. *Brain Res*. 1032: 131 – 140.

Raisinghani, M., Faingold, C.L. (2005b). Evidence for perirhinal cortex as a requisite component in the seizure network following seizure repetition in an inherited form of generalized clonic seizures. *Brain Res*. 1048: 193 – 201.

Raisinghani, M., Faingold, C.L. (2005c). Pontine reticular formation neurons are implicated in the neuronal network for generalized clonic seizures which is intensified by audiogenic kindling. *Brain Res*. 1064: 90 – 97.

Redrobe, J.P., Calo, G., Guerrini, R., Regoli, D., Quirino, R. (2000). [Nphe¹]nociceptin (1-13)NH₂, a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats. *Brit. J. Pharmacol*. 131: 1379 – 1384.

Redrobe, J., Calo, G., Regoli, D. (2002). Nociceptin receptor antagonists display antidepressant-like properties in the Mouse forced swimming test. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 365: 164 – 167.

Reid, H.M., Collins, R.L. (1986). Lateralized audiogenic seizure: motor asymmetries exhibited and the effects of interrupted stimulation. *Behav. Neural Biol.* 46: 424 - 431.

Reigel, C.E., Dailey, J.W., Jobe, P.C. (1986). The genetically epilepsy-prone rat: an overview of seizure-prone characteristics and responsiveness to anticonvulsant drugs. *Life. Sci.* 39: 733 – 744.

Reinscheid, R.K., Nothaker, H.P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Mosma, 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., Ardati, A., Monsma, F.J., Civelli, O. (1996). Structure-activity relationship studies on the novel neuropeptide orphanin FQ. *J. Biol. Chem.* 271: 14163-14168.

Reinscheid, R.K., Knautt, K., Koester, A., Montkowski, A., Civelli, O. (1999). OFQ/N and the endogenous opioids act synergistically in protecting from excessive sensation of fear and pain. In *International Narcotics Research Conference, 30th meeting. Saratoga Springs, NY, July 10-15.*

Reinscheid, R.K., Civelli, O. (2002). The orphanin FQ/nociceptin knockout mouse: A behavioural model for stress responses. *Neuropeptides.* 36: 72-76.

Riaz, A., Faingold, C.L. (1994). Seizures during ethanol withdrawal are blocked by focal microinjection of excitant amino acid antagonists into the inferior colliculus and pontine reticular formation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18: 456 – 462.

Ribak, C.E., Khurana, V., Lien, N.T. (1994). The effect of midbrain collicular knife cuts on audiogenic seizure severity in the genetically epilepsy-prone rat. *J. Hirnforsch.* 35(2): 303 – 311.

Ribak, E.E., Morin, C.L. (1995). The role of the inferior colliculus in a genetic model of audiogenic seizures. *Anat. Embryol.* 191: 279 – 295.

Rice, A.C., DeLorenzo, R.J. (1998). NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. *Brain Res* 782: 240 – 247.

Riedl, M., Shuster, S., Vulchanova, L., Wang, J.L., Loh, H.H., Elde, R. (1996). Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive nerve fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord. *Neuroreport* 7: 1369–1372.

Rocha, L., Cuellar-Herrera, M.C., Velasco, M., Velasco, F., Velasco, A.L., Jiménez, F., Orozco-Suarez, S., Borsodi, A. (2007). Opioid receptor binding in parahippocampus of patients with temporal lobe epilepsy: Its association with the antiepileptic effects of subacute electrical stimulation. *Seizure.* 16: 645-652.

Romualdi, P., Donatrin, A., Bregola, G., Bianchi, C., Beani, L., Ferri, S., Simonato, M. (1995). Early changes in prodynorphin mRNA and ir-dynorphin A levels alter kindled seizures in the rat. *Eur. J. Neuroscience.* 7: 1850 – 1856.

Ross, K.C., Coleman, J.R. (1999). Audiogenic seizures in the developmentally primed Long-Evans rat. *Dev. Psychobiol.* 34(4): 303 – 313.

Ross, K.C., Coleman, J.R. (2000). Developmental and genetic audiogenic seizure models; behaviour and biological substrates. *Neurosci Biobehav. Rev.* 24(6): 639 – 653.

Rossi, G.C., Mathis, J.P., Pasternak, G.W. (1998) Analgesic activity of orphanin FQ2, murine prepro-orphanin FQ_{141–157}, in mice. *Neuroreport* 9: 1165–1168.

Rubaj, A., Zgodzinski, W., Gustaw, K., Sieklucka-Dziuba, M. (2002). Nociceptin, OP4 receptor ligand in different models of experimental epilepsy. *Peptide* 23: 497 – 505.

Sakamoto, T., Niki, H. (2001). Acoustic priming lowers the threshold for electrically induced seizures in mice inferior colliculus, but not in the deep layers of superior colliculus. *Brain. Res.* 898 (2). 358 – 363.

Saitou y Nei (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987 Jul;4(4):406-25.

Samoriski, G.M., Piekut, D.T., Applegate, C.D. (1997). Differential spatial patterns of fos induction following generalized clonic and generalized tonic seizures. *Exp. Neurol.* 143(2): 255-268.

Sanchez-Alvarez, M., Anton, B., Sanchez-Islas, E., Leon- Olea, M. (1997). Distribution of orphanin FQ-like immunoreactivity in the perioesophageal ganglia of the snail *Helix aspersa*. *Neurosci Abstr.* 23(1): 980- 981.

Sandin, J., Georgieva, J., Schott, P.A., Ogren, S.O., Terenius, L. (1997). Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. *Eur J Neurosci.* 9: 194–197.

Sandin, J., Ögren, S.O., Terenius, L. (2004). Nociceptin/orphanin FQ modulates spatial learning via ORL1 receptor in the dorsal hippocampus of the rat. *Brain Research.* 997: 222 – 233.

Saunders, s.E., Burke, J.F., Benjamin, P.R. (2000). 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.

Savage, D.D., Mills, S:A., Jobe, P.C., Reigel, C:E. (1988). Elevation of Naloxone-sensitive 3H- Dihydromorphine binding in hippocampal formation of genetically epilepsy-prone rats. *Life. Sci.* 43: 239 – 246.

Schindler, K., Elger, C.E., Lehnertz, K. (2007) Increasing synchronization may promote seizure termination: Evidence from status epilepticus. *Clinical Neurophysiology.* 118: 1955-1968.

Scimemi, A., Schorge. S., Kullmann D.M., Walker, M.C. (2006). Epileptogenesis is associated with enhanced glutamatergic transmission in the perforant path. *J. Neurophysiol.* Feb, 95(2): 1213 – 1220.

Senba, E., Matsunaga, K., Tohyama, M., Noguchi, K. (1993). Stress-induced c-fos expression in the rat brain: Activation mechanism of sympathetic pathway. *Brain Res. Bull.*, 31: 329 – 344.

Simler, S., Hirsch, E., Danober, L., Motte, J., Vergnes, M., Marescaux, C. (1994). C-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats. *Neurosci. Lett.* 175, 58-62.

Simler, S., Vergnes, M., Marescaux, C. (1999). Spatial and temporal relationships between c-fos expression and kindling of audiogenic seizures in Wistar rats. *Exp. Neurol.* 157: 106 – 119.

Simmons, M.L., Chavkin, C. (1996). Endogenous opioid regulation of hippocampal function. *Int. Rev. Neurobiol.* 39: 145 – 196.

Simon, E.J., Hiller, J.M., Edelman, I. (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [³H]- etorphine to rat brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1947-1049.

Simonato, M., Romualdi, P. (1996). Dynorphin and epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 50: 557 – 583.

Singer, W. (1999). Neuronal synchrony: A versatile code of the definition of relations?. *Neuron.* 24: 49 – 65.

Snead, O. C. 3 rd. (1992). Evidence for GABAB – mediated mechanisms in experimental generalized absence seizures. *Eur. J. Pharmacol.* 31: 343 – 349.

Snyder-Keller, A.M., Pierson, M.G. (1992). Audiogenic induce c-fos in a model of developmental epilepsy. *Neurosci. Lett.* 135: 108-112.

Solbrig, M.V., Adrian, R., Baratta, J., Lauterborn, J.C., Koob, G.F. (2006). Kappa opioid control of seizures produced by a virus in an animal model. *Brain.* 129: 642 – 654.

Soria, M.A., Macias, J.A., Aguirre, A., Gómez, P., Gómez, M.E. (1987). Epilepsia audiógena en una cepa endogámica de hámsters dorado (*Mesocricetus auratus*). Rev. Esp. Epilepsia. 2 (1): 27 – 33.

Spencer, S.S. (2002). Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. Epilepsia. 43 (3): 219 – 227.

Stogmann, E., Zimprich, A., Baumgartner, C., Aull-Watschinger, S., Hollt, V., Zimprich, F. (2002). A functional polymorphism in the prodynorphin gene promoter is associated with temporal lobe epilepsy. Ann. Neurol. 51: 260 – 263.

Sudbury, J.R., Avioli, M. (2007). Epileptiform synchronization in the rat insular and perirhinal cortex in vitro. Eur. J of Neuroscience. Vol 26 (12): 3571 – 3582.

Tallent, M., Madamba, S.G., Siggins, G.R. (2001). Nociceptin reduce epileptiform events in CA3 hippocampus via presynaptic and postsynaptic mechanisms. J. Neuroscience. 21 (17): 6940 – 6948.

Temkin, O. (1971). The falling sickness. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Terenius, L. (1973). Stereospecific interaction between narcotic analgesic and synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. Acta Pharmacol. Toxicol. 32: 317-320.

Terra, V.C., Garcia-Cairasco, N. (1992). Neuroethological evaluation of audiogenic seizures and audiogenic- like seizures induced by microinjection of bicuculline into the inferior colliculus II. Effects of nigral clobazam microinjections. Behav. Brain Res. 52: 19 – 28.

Tian, J-H., Xu, W., Fang, Y., Mogil, J.S., Grisel, J.E., Grandy, D.K., Han, J-S. (1997). Bidirectional modulatory effect of orphanin FQ on morphine-induced analgesia: antagonism in brain and potentiation in spinal cord of rat. *Br J Pharmacol.* 120: 676–680.

Tongjaroenbungam, W., Jongkamonwiwat, N., Cunningham, J., Phansuwan-Pujito, P., Dodson, H.C., Forge, A., Govitrapong, P., Casalotti, S.O. (2004). Opioid

modulation of GABA release in the rat inferior colliculus. *BMC Neuroscience*. 5: 31 – 36.

Tongjaroenbungam, W., Jongkamonwiwat, N., Phansuwan-Pujito, P., Casalotti, S.O., Forge, A., Dodson, H., Govitrapong, P., (2006). Relationship of opioid receptors with GABAergic neurons in the rat inferior colliculus. *Eur. J. Neurosci*. 24(7): 1987-1994.

Topham, C.M., Mouledous, L., Poda, G., Maigret, B., Meunier, J.C. (1998). Molecular modelling of the ORL1 receptor and its complex with nociceptin. *Protein Eng* 11: 1163–1179.

Tortella, F.C.(1988). Endogenous opioid peptides and epilepsy: quieting the seizing brain?. *Trends Pharmacol. Sci*. 9 (10): 366 – 372.

Traub, R.D., Whittington, M.A., Buhl, E.H., LeBeau, F.E., Bibbig, A., Boyd, S., Cross, H., Baldeweg, T., (2001). A possible role for gap junctions in generation of very fast EEG oscillations preceding the onset of, and perhaps initiating, seizures. *Epilepsia*. 42 (2): 153 – 170.

Ueda, H., Inoue, M., Takeshima, H., Iwasawa, Y. (2000). Enhanced spinal nociceptin receptor expression develops morphine tolerance and dependence. *J Neurosci*. **20**: 7640–7647.

Uemura, Y., Kowall, N.W., Moskowitz, M.A. (1991). Focal ischemia in rats causes time-dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in widespread regions of ipsilateral cortex. *Brain Res.*, 552: 99 – 105.

Uhlhaas, P.J., Singer, W. (2006). Neural synchrony in Brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron*. 52: 155 – 168.

Urca, G., Frenk, H. (1980). Pro- and Anticonvulsant action of morphine in Rats. *Pharm. Biochemistry & Behavior*. Vol 13: 343 – 347.

Varela, F., Lachaux, J.P., Rodríguez, E., Martinerie, J. (2001). The brainweb: Phase synchronization and large-scale integration. *Nature Rev.* vol 2: 229 – 239.

Vaughan, C.W., Ingram, S.L., Christie MacD. (1997). Actions of the ORL1 Receptor Ligand Nociceptin on Membrane Properties of Rat Periaqueductal Gray Neurons *In Vitro*. *Jof Neuroscience*. 17(3): 996-1003.

Vinogradova, L., Vinogradov, V.Y., Kuznetsova, G.D. (2006). Unilateral cortical spreading depression is an early marker of audiogenic kindling in awake rats. *Epilepsy Res*. 71: 64 – 75.

VonVoigtlander P.F., Hall, E.D., Camacho Ochoa, M., Lewis R.A., Triezenberg, H.J. (1987). U-54494A: A unique anticonvulsant related to kappa opioide agonists. *The Jor. Pharm and Exp. Therapeutics*. 542 – 547.

Waldhoer, M., Barlett, S.E., Whistler, J.L. (2004) Opioid receptors. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:953-90.

Walthers, E.A., Bradford, C.S., Moore, F.L. (2005) Cloning, pharmacological characterization and tissue distribution of an ORL1 opioid receptor from an amphibian, the rough-skinned newt *Taricha granulosa*. *J Mol Endocrinol*. 2005 Feb;34(1):247-56.

Wang, J.B., Johnson, P.S., Imai, Y., Persico, A.M., Ozenberger, B.A., Eppler, C.M., Uhl, G.R. (1994). cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett*. 348: 75-79.

Wang, J-L., Zhu, C-B., Cao, X-D., Wu, G-C. (1999) Distinct effect of intracerebroventricular and intrathecal injections of nociceptin/orphanin FQ in the rat formalin test. *Regul Peptides*. 79: 159–163.

Wang HL, Kuo YL, Hsu CY, Huang PC, Li AH, Chou AH, Yeh TH, Chen YL. (2006) Two C-terminal amino acids, Ser(334) and Ser(335), are required for homologous desensitization and agonist-induced phosphorylation of opioid receptor-like 1 receptors. *Cell Signal*.18(5):670-8.

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 μ , δ and κ opioid receptors. *Mol. Brain Res*. 27: 37-44.

Wick, M.J., Minnerath, S.R., Roy, S., Ramakrishnan, S., Loh, H.H., (1995). Expression of alternate forms of brain opioid 'orphan' receptor mRNA in activated peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines. *Mol. Brain Res.* 32: 342-347.

Willot, J.F., Lu, S.M. (1980). Midbrain pathways of audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Exp. Neurol.* 70: 288 – 299.

Wilson-Kinnier, J.V., Reynolds, E.H. (1990). Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a babylonian treatise on epilepsy. *Medical history.* 23: 299.

Witta, J., Palkovits, M., Rosenberger, J., Cox, B.M. (2004) Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain. *Brain Res.* 997(1): 24-29.

Xie, G.X., Meuser, T, Pietruck, C., Sharma, M., Palmer, P.P. (1999). Presence of opioid receptor-like (ORL1) receptor mRNA splice variants in peripheral sensory and sympathetic neuronal ganglia. *Life Sci* 64: 2029–2037.

Xie, G.X., Ito, E., Maruyama, K., Pietruck, C., Sharma, M., Yu, L.C., Palmer, P.P. (2000). An alternatively spliced transcript of the rat nociceptin receptor ORL1 gene encodes a truncated receptor. *Mol Brain Res* 77: 1–9.

Yang, L., Long, C., Faingold, C.L. (2001). Audiogenic seizure susceptibility is induced by termination of continuous infusion of GABA or an NMDA antagonist into the inferior colliculus. *Exp. Neurol.* 171: 147 – 152.

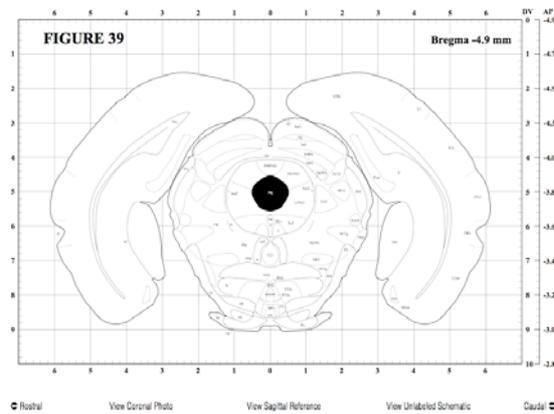
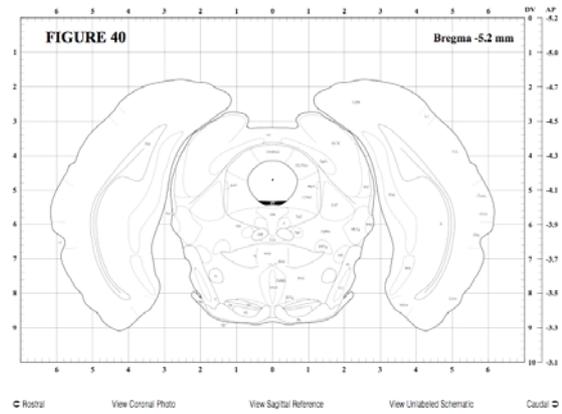
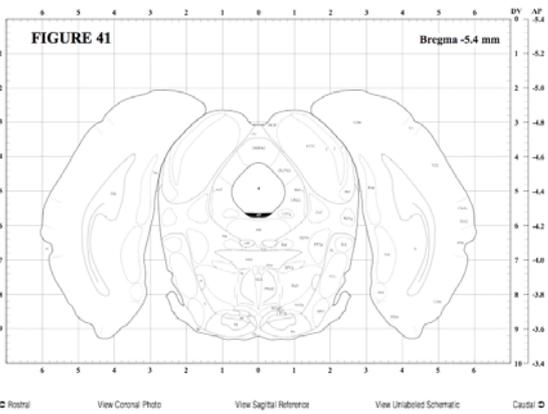
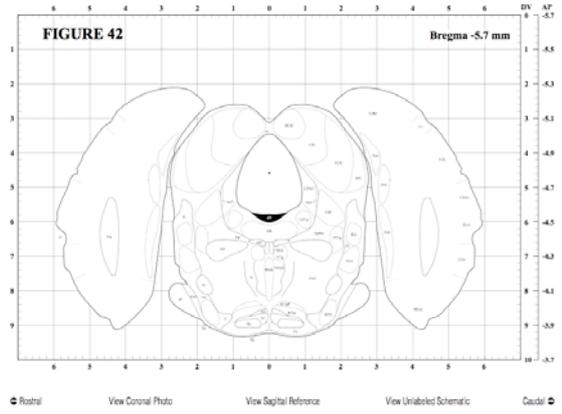
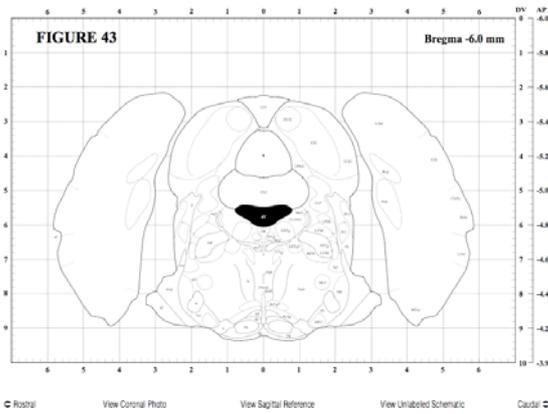
Yang, L., Long, C., Randall, M.E., Faingold, C.L. (2003). Neurons in the periaqueductal gray are critically involved in the neuronal network for audiogenic seizures during ethanol withdrawal. *Neuropharmacology.* 44 (2): 275 – 281.

Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C.D., Takeda, J., Reisine, T., Bell, G.I. (1993). Cloning and functional comparison of k and d opioide receptor from the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6736-6740.

Yu, T.P., Xie, C.W. (1998). Orphanin FQ/Nociceptin Inhibits synaptic transmission and Long- Term Potentiation in rat dentate gyrus through post synaptic mechanisms. *J Neurophysiol.* 80 (3): 1277 – 1284.

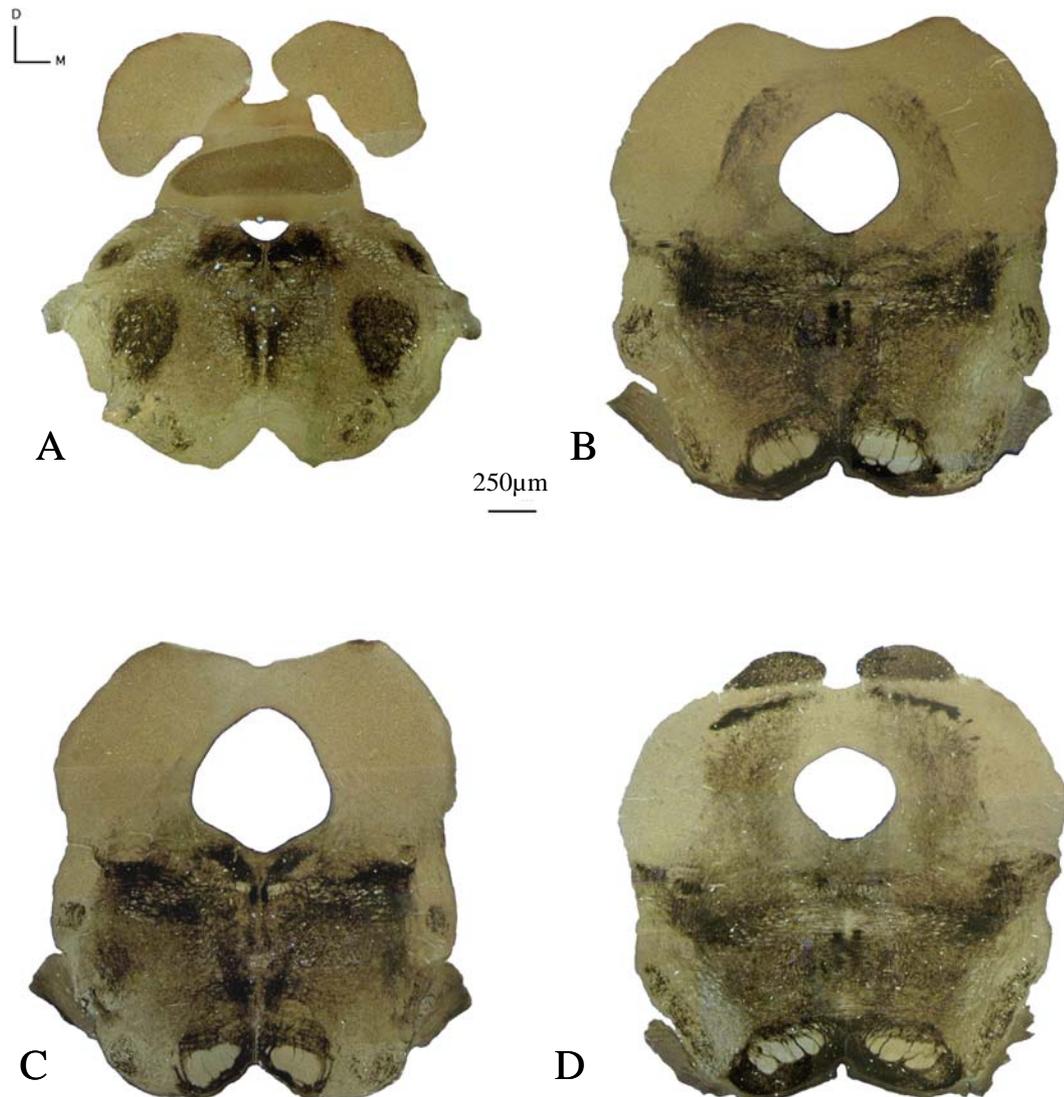
Anexos

Anexo 1



Anexo 1: Esquemas del atlas estereotáxico de Morin y Word, (2001), utilizados en el estudio, organizados en dirección caudal a rostral, planchas 43,42,41 y 39.

Anexo 2



Anexo 2: Tinción histoquímica de la acetil- colinesterasa en la región troncoencefalica de secciones cerebrales de hámster. Secciones coronales de hámsters ordenadas caudo-rostralmente e histoquímicamente procesadas para visualizar núcleos cerebrales.

Anexo 3

Protocolo de tinción de Nissl

1. **Objeto:** Poner de manifiesto los núcleos de las células nerviosas, así como la sustancia tigróide de las neuronas.

2. **Procedimiento.**
 - a. Sumergir durante 10 minutos en solución de violeta de cresilo al 1% en agua destilada a 60°C.
 - b. Realizar dos lavados de 5 segundos en agua destilada.
 - c. Realizar un lavado de 30 segundos en etanol al 50%.
 - d. Realizar un lavado de 30 segundos en etanol al 70%.
 - e. Sumergir durante 30 segundos en etanol al 96% con ácido acético al 0,5%.
 - f. Realizar dos pases por etanol absoluto de 20 segundos cada uno.
 - g. Realizar un pase de 30 segundos en cloroformo.
 - h. Realizar dos pases de 30 segundos cada uno en etanol absoluto.
 - i. Realizar tres pases por xilol de 5 minutos cada uno.
 - j. Sella el cubreobjetos con Entellan, Neu.

Violeta de cresilo: (C-1791, Sigma)

Entellan, Neu: (MERCK)

Etanol absoluto: (Panreac)

Xiol (Panreac)

Cloroformo (Panreac)