

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**Estudio de los receptores opioides y su implicación en la regulación de
procesos del desarrollo embrionario del pez cebra**

Fátima Macho Sánchez-Simón

2011

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA



Estudio de los receptores opioides y su implicación en la regulación de procesos del desarrollo embrionario del pez cebra

**Memoria presentada por Fátima Macho Sánchez-Simón
para optar al Título de Doctor**

Fdo. Fátima Macho Sánchez-Simón

DRA. Dña. RAQUEL E. RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, PROFESORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**Estudio de los receptores opioides y su implicación en la regulación de procesos del desarrollo embrionario del pez cebra**”, que presenta la doctorando D. Fátima Macho Sánchez-Simón, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León, y reúne a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado.

Salamanca a 26 de Enero de 2011.

Fdo. Prof. Raquel E. Rodríguez Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Quizás la lección más importante que he aprendido durante la realización de la *Tesis Doctoral* es que la mejor investigación se realiza en colaboración. Esta colaboración no siempre implica ayuda e intercambio en la realización de experimentos y discusión de los resultados obtenidos, sino que se manifiesta en apoyo y buen ambiente en el trabajo, en el establecimiento y mantenimiento de buenas relaciones personales con los compañeros, que en muchos casos, llegan a convertirse en los mejores amigos. Por todo ello, quiero dar las gracias particularmente:

- A la Prof. Raquel E. Rodríguez, por la confianza que ha depositado en mí, por su incansable esfuerzo por transmitirme ilusión por la ciencia, por creer siempre en la capacidad de superación de la persona. El acompañamiento científico y profesional que gratuitamente me ha brindado han supuesto el descubrimiento de nuevos horizontes en mi vida, a los que con su ayuda, me enfrento con entusiasmo y alegría.

- A los Doctores Iván Rodríguez y Javier Herrero, por su amistad, disponibilidad, calidad humana y buenos consejos, en el trabajo y en la vida.

- A todos mis compañeros de laboratorio, con los que a lo largo de estos años he compartido tantas experiencias profesionales y personales. A la Dra. Verónica González, por su cercanía y amistad; a los doctores Ezequiel Marrón, Javier Arenzana, porque en distintas etapas de mi formación han sido un gran apoyo dentro del grupo, y de los que he aprendido importantes lecciones y a Oscar Blanco, por compartir conmigo el hecho de que no hay buena ciencia sin música. Quisiera agradecer de manera especial a Roger López y a Katty Barreto la ilusión que me han transmitido durante la última etapa, así como su constante apoyo y leal amistad.

- Al grupo de Biología Celular, por facilitarme la utilización de su material cuando ha sido necesario y por la buena relación personal que nos une. Quiero mencionar de manera especial a Rosario Sánchez y a Adrián Santos, por brindarme su confianza, cariño y amistad. A Marta, Parrilla por los buenos ratos compartidos.

- Al Prof. Segundo Píriz, quien me transmitió el gusto por la investigación enseñándome que no sólo hay que tener calidad como científico, sino también como persona, sin renunciar nunca a los principios personales.

- A la profesora Maite Núñez, por la formación académica y personal que he recibido de ella, además de su amistad y cariño.

- A los doctores Ping-Yee Law y Patrick Blader, por permitirme realizar sendas estancias en sus laboratorios, por su sincera preocupación por mi formación científica y desinteresada ayuda para conseguir los objetivos planteados para cada estancia.

- A mis amigos, porque a pesar de mis “ausencias”, siempre han estado a mi lado, mostrándome que hay vida fuera del laboratorio.

- A la Junta de Castilla y León, por proporcionarme la beca para realizar esta Tesis Doctoral.

- En último lugar, pero el más importante, a mi familia, empezando por mis padres, que me lo han dado todo sin pedir nada a cambio. Por haber estado siempre a mi lado y apoyar mis decisiones. A mi hermana, porque ha estado conmigo en todo momento, especialmente cuando lo he necesitado. A mi abuela, por su constante desvelo por mi bienestar y la educación que de ella he recibido. A mis tíos y primos, fundamentales en mi desarrollo como persona y en mi vida. Y a mi nueva familia por el apoyo continuo durante estos años y por enseñarme que a través de mi profesión puedo servir a la humanidad.

*Esta Tesis está dedicada a mis padres,
Ángela y Juan Manuel*

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	
I. 1. Dolor, agentes opioides y adicción	2
I. 2. Receptores opioides	7
I. 3. Opioides y desarrollo	12
I. 4. Sistema dopaminérgico	13
I. 5. Regulación transcripcional a través de micro RNAs	16
I. 6. Rutas de señalización durante el desarrollo embrionario:	
Wnt1 y Notch.	19
I.6-1. Wnt1	20
I.6-2. Notch	21
I. 7. El pez cebra como modelo experimental	23
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	29
III. MATERIAL Y METODOS	33
III. 1. Mantenimiento y cría de embriones	34
III. 2. Exposición de embriones de pez cebra a diferentes sustancias ..	36
III. 3. Extracción de RNA total	38
III. 4. Síntesis de cDNA	39
III. 5. PCR cuantitativa absoluta	39
III. 6. Microarray de micro RNAs	42
III. 7. Hibridación <i>in situ</i> en embriones de pez cebra	43
III. 8. Detección inmunohistoquímica en embriones de pez cebra	46
III. 9. Clonación de la región 3'UTR de Pitx3	48
III. 10. Microinyección de morfolidos y DNA	50
IV. RESULTADOS	53
IV. 1. Introducción	54
IV. 2. Expresión de los receptores opioides durante el desarrollo embrionario del pez cebra	56

Receptor opioide mu (ZfMOR)	57
Receptores opioides delta 1 (ZfDOR1) y delta 2 (ZfDOR2)	58
IV. 3. Estudio de la expresión de ORL durante el desarrollo embrionario del pez cebra: influencia de la morfina y la nociceptina ..	60
IV. 4. Influencia de la morfina en la expresión de los receptores opioides y en los cambios celulares y neuronales durante el desarrollo embrionario del pez cebra	66
IV. 5. Influencia de la morfina sobre la cascada de regulación del miR-133b mediante la activación del receptor opioide mu	76
IV. 6. Análisis de la actividad neuroprotectora de la morfina a través de la activación de los receptores opioides tipo delta y su relación con el miR-133b y sus genes diana	84
IV. 7. Estudio de sistemas de señalización intracelular cuya transcripción puede ser regulada por el sistema opioide	90
IV. 7-1. Influencia del sistema opioide en la expresión de Wnt1.....	91
IV. 7-2. Implicación del sistema opioide en la señalización de Notch	99
V. DISCUSIÓN	105
V. 1. Expresión de los receptores opioides durante el desarrollo embrionario del pez cebra	107
V. 2. Estudio de la expresión de ORL durante el desarrollo embrionario del pez cebra: influencia de la morfina y la nociceptina	111
V. 3. Influencia de la morfina en la expresión de los receptores opioides y en los cambios celulares y neuronales durante el desarrollo embrionario del pez cebra	114
V. 4. Influencia de la morfina sobre la cascada de regulación del miR-133b mediante la activación del receptor opioide mu	118
V. 5. Análisis de la actividad neuroprotectora de la morfina a través de la activación de los receptores opioides tipo delta y su relación con el miR-133b y sus genes diana	123
V. 6. Estudio de sistemas de señalización intracelular cuya transcripción puede ser regulada por el sistema opioide	127
V. 6-1. Influencia del sistema opioide en la expresión de Wnt1....	127
V. 6-2. Implicación del sistema opioide en la señalización de Notch	131

VI. CONCLUSIONES	135
VII. BIBLIOGRAFÍA	141
VIII. ANEXOS	153

Artículos publicados partiendo de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral (Orden Cronológico)

- 1. Sanchez-Simon FM and Rodriguez RE (2008) Developmental expression and distribution of opioid receptors in zebrafish. *Neuroscience* 151(1):129-137.**
- 2. Macho Sanchez-Simon F, Rodriguez RE (2009) Expression of the nociceptin receptor during zebrafish development: influence of morphine and nociceptin. *Int J Dev Neurosci.* 27(4):315-20.**
- 3. Sanchez-Simon FM, Arenzana FJ and Rodriguez RE (2010) In vivo effects of morphine on neuronal fate and opioid receptor expression in zebrafish embryos. *Eur J Neurosc* 32(4):550-559.**
- 4. Sanchez-Simon FM, Zhang XX, Loh HH, Law PY, Rodriguez RE. (2010) Morphine regulates dopaminergic neuron differentiation via miR-133b. *Mol Pharmacol.* 78(5):935-42.**
- 5. Rivas-Boyero AA, Herrero-Turrion MJ, Gonzalez-Nunez V, Sanchez-Simon FM, Barreto-Valer K, Rodriguez RE (2011) Pharmacological characterization of a nociceptin receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Endocrinol.* En prensa.**

I. INTRODUCCION

El trabajo que presentamos en esta Tesis Doctoral pretende contribuir a un mejor conocimiento del funcionamiento del sistema opioide, utilizando el pez cebra como modelo experimental, con el fin de alcanzar una mejor comprensión, a través de este modelo, de los mecanismos que rigen la modulación de la sensación dolorosa, la adicción que producen los fármacos que hoy se utilizan para esta modulación, además de determinar otras funciones (teratogenia, posible neurogénesis y neuroprotección entre otras) que pueda tener el sistema opioide en vertebrados, centrándonos en los receptores opioides.

I.1. DOLOR, AGENTES OPIOIDES Y ADICCIÓN

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) ha definido el término “dolor” como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular real o potencial y que incluye una serie de conductas relacionadas con el dolor, visibles o audibles, que pueden ser modificadas por el aprendizaje” (León-Olea, 2002). El dolor es una de las sensaciones principales que el organismo percibe cuando se encuentra en una situación de anomalía funcional que pone en peligro su integridad. Por otra parte, la nocicepción, término que proviene de la palabra latina “*nocere*” (herir), es la transmisión de señales procedentes de una lesión tisular o irritación que se perciben normalmente en forma de dolor o picor. La nocicepción está modulada por factores psicobiológicos, y se puede percibir o no como dolor, dependiendo del entorno, el ámbito cultural y los hábitos familiares. Por lo tanto, no es lo mismo dolor que nocicepción: la nocicepción es el mecanismo por el que los estímulos nocivos periféricos se transmiten al Sistema Nervioso Central y

sin embargo el dolor es una experiencia subjetiva que no siempre se asocia a la nocicepción (Julius and Basbaum, 2001).

El dolor ha sido y es un problema presente a lo largo de toda la historia de la humanidad y por lo tanto, la búsqueda de un remedio definitivo para aliviarlo o eliminarlo ha sido una constante en los anales de la Medicina. Desde tiempos remotos se han empleado como analgésicos los principios activos derivados del opio, que se extrae de la adormidera *Papaver somniferum* (Fig. 1). Las primeras referencias indican que ya en el año 3400 a. C. se cultivaba la adormidera en la Baja Mesopotamia, y los sumerios se referían a ella como “*Hul Gil*”, la planta de la felicidad. En el año 340 a. C. Hipócrates, el padre de la Medicina occidental, atribuyó al opio propiedades narcóticas y desde ese momento se estableció su uso con fines medicinales. Por otro lado, el opio, junto con los productos derivados de la fermentación alcohólica, fue, probablemente, una de las primeras sustancias que el hombre empleó con fines lúdicos, debido a sus características psicoactivas, por lo que paralelamente a su uso se desarrolló su abuso. Fue sin embargo durante el siglo XVII cuando aparecieron las primeras referencias históricas (Brownstein, 1993) que describen los primeros casos clínicos de dependencia física y psíquica al opio. Cabe destacar que el poder adictivo del opio, uno de sus

efectos secundarios más adversos, no sólo constituye un serio problema médico, sino también ha provocado problemas sociales, económicos e incluso políticos, tan graves como las Guerras del Opio en el siglo XIX.



Figura 1. *Papaver somniferum*, conocida como adormidera. Imagen obtenida de <http://www.opioids.com/afghanistan/index.html>.

En 1805, el farmacéutico alemán Friedrich Sertürner (1783-1841) aisló el principal componente activo del opio, que describió como "*Principium Somniferum*" y lo llamó morfina (Fig. 2) en honor de Morfeo, el dios griego del sueño (Daintith et al., 1981). Debe destacar que la morfina es el primer compuesto químico puro aislado e identificado como el principio activo de un producto natural. Aunque la morfina supone el 15% del peso total del opio, éste también contiene otros alcaloides tales como: la codeína o metilmorfina (0.5% en peso del opio), con propiedades antitusígenas y ligeramente adictivas; tebaína o dimetilmorfina (1%), que posee efectos proconvulsionantes pero no analgésicos; papaverina con ligeras propiedades relajantes musculares (1%); y noscapina con efectos antitusígenos (10%).

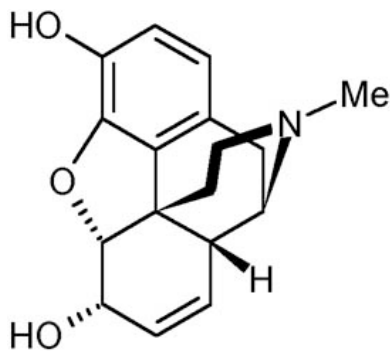


Figura 2. Estructura química de la morfina

Una vez aislada y conocidas sus características, la morfina comenzó a utilizarse como compuesto analgésico y anestésico. En 1843, se descubrió que la administración intravenosa de la morfina mediante el empleo de la jeringuilla hipodérmica producía efectos instantáneos y tres veces más potentes que mediante su administración oral. Al demostrarse que la morfina era tan adictiva como el opio se comenzó la búsqueda de otros compuestos derivados de la morfina que no produjeran adicción. Así, en 1895 Heinrich Dreser, trabajando para la compañía Bayer, sintetizó un derivado diacetilado, la diacetilmorfina, una droga que teóricamente no tenía los efectos secundarios de la morfina (Ferreiro, 2003). Tres años después se comercializó con el nombre de heroína

(Fig. 3), pero muy pronto se descubrió que esta droga no podía emplearse como sustituto de la morfina, puesto que presentaba las mismas propiedades adictivas (para una revisión más completa de los aspectos históricos del uso del opio y la morfina ver: (Brownstein, 1993).

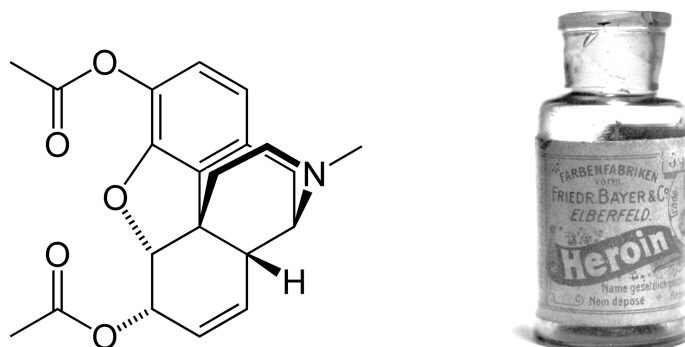


Figura 3. Estructura química de la heroína. Jarabe de heroína comercializado por la empresa farmacéutica Bayer (1895).

Actualmente existe una gran variedad de compuestos opioides, que pueden clasificarse por su origen y por su estructura: se conocen opiáceos naturales como la morfina, alcaloides fenantrénicos de estructura parecida a la morfina (codeína y tebaína), y alcaloides bencil-isoquinolínicos (noscapina y papaverina). También existen compuestos opiáceos semisintéticos, entre los que se pueden destacar la heroína, hidrocodona (nombre comercial, Vicodin), meperidina (nombre comercial, Demerol), oxicodona (nombre comercial, Percodan), buprenorfina y etorfina; cabe mencionar que muchos de estos compuestos se sintetizan a partir de la tebaína. Los opiáceos sintéticos presentan distintas estructuras no relacionadas desde el punto de vista químico pero con efectos farmacológicos semejantes a la morfina; entre ellos destacamos las difenilpropilaminas como la metadona, las piperidinas como el fentanilo, el tramadol y los benzomorfanos tales como la metazocina y pentazocina.

Los compuestos opiáceos producen analgesia al inhibir tanto las vías aferentes nociceptivas como las vías eferentes en las astas posteriores de la médula espinal. También actúan sobre las neuronas de la sustancia gris periacueductal, en regiones de la corteza y en el sistema límbico. En este último caso, los opioides alteran la integración de la información nociceptiva, por lo que modulan la respuesta emocional del individuo ante el dolor (Fields et al., 1991).

Aunque la adicción es uno de los efectos secundarios más importantes de los opiáceos, también presentan otros efectos indeseables que impiden que estos agentes químicos se puedan considerar como fármacos adecuados para el control de la sensación dolorosa, entre los que podemos citar los siguientes: depresión respiratoria, afectando más a la frecuencia que a la amplitud, y a dosis altas son capaces de producir ritmos anormales y apnea; depresión del reflejo tusígeno, alteración del ritmo cardiaco, hipotensión debida a la vasodilatación venosa y arterial, hipotermia de origen hipotalámico, hipertonia muscular y convulsiones; depresión del sistema inmune y alteración en la funcionalidad de macrófagos, células NK y células de las estirpes T y B; modificación de la secreción hipofisaria, inducción de náuseas y vómitos, estreñimiento, miosis y alteraciones emocionales, como la euforia o disforia al actuar sobre el sistema límbico (Collado y Torres, 1999).

Cabe destacar que entre la gran diversidad de compuestos opioides conocidos, la morfina sigue siendo hoy en día uno de los fármacos de elección en casos de dolor crónico, a pesar de los efectos secundarios que presenta. Asimismo, la morfina es el fármaco de referencia, junto a los agentes opioides endógenos, para el diseño y la evaluación de nuevos productos analgésicos.

I.2. RECEPTORES OPIOIDES

El descubrimiento de péptidos opioides endógenos, concretamente de las encefalinas, en el año 1973 (Pert et al., 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973) puso de manifiesto la existencia de un sistema opioide endógeno (Martin et al., 1976), corroborando la hipótesis de la existencia de receptores opioides, a los cuales se unirían tanto la morfina como los opioides endógenos. Uno de los problemas que surgen al intentar comprender el sistema opioide es la constatación de la existencia de más de un receptor responsable de la actividad que presentan los agentes con características opioides. Hoy se distinguen cuatro tipos de receptores opioides diferentes: MOR, DOR, KOR y ORL. En 1992, Evans y Kieffer simultáneamente clonaron el primer receptor opioide, el receptor opioide delta (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992). Posteriormente se clonaron el receptor opioide mu (Fukuda et al., 1993; Wang et al., 1993), el receptor opioide kappa (Yasuda et al., 1993) y el receptor ORL (Mollereau et al., 1994). La existencia de más de un receptor responsable de la actividad que presentan los agentes con características opioides constituye uno de los problemas que surgen al intentar comprender el sistema opioide. Las sustancias opioides, tanto exógenas como endógenas, ejercen su acción cuando se unen a los receptores opioides. Los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), cuya importancia estriba en que intervienen en el mecanismo de acción de la mayoría de las hormonas y neurotransmisores conocidos. Los receptores opioides están constituidos por un dominio N-terminal extracelular, 7 dominios transmembrana conectados por 3 lazos intracelulares y 3 lazos extracelulares y una cola C-terminal intracelular (Fig. 4).

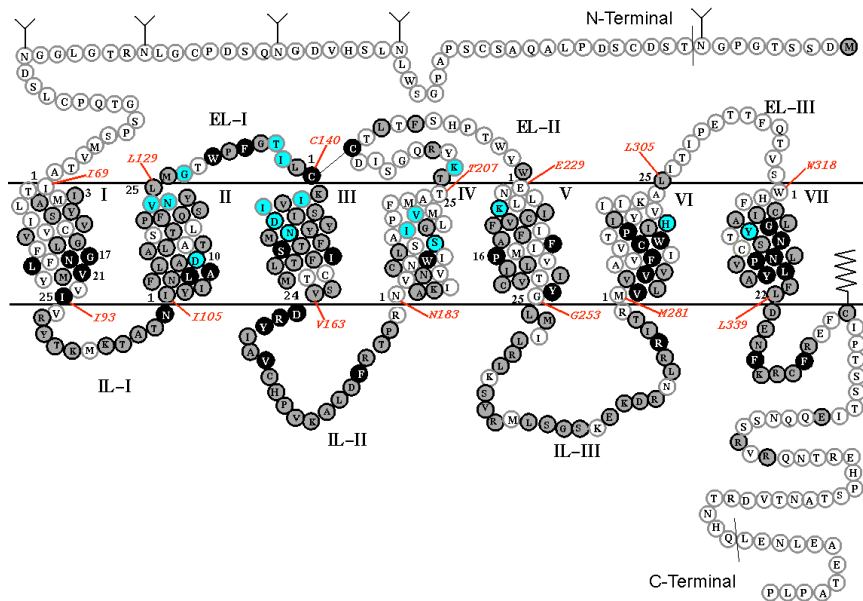


Figura 4. Estructura bidimensional del receptor opioide mu, semejante a la de los otros receptores opioides. Se destacan los lazos extracelulares EL-I, EL-II, EL-III, los dominios transmembrana I, II, III, IV, V, VI y VII, los lazos intracelular IL-I, IL-II, IL-III, y los extremos N-Terminal y C-Terminal. Figura obtenida de <http://www.opioid.umn.edu/muttabs/mumap.html>.

Según su estructura tridimensional, se presume que los dominios transmembrana de los receptores opioides forman hélices muy unidas, orientadas en contra de las agujas del reloj. Junto a los lazos extracelulares, esta estructura da lugar a una interfase dinámica a la cual se unen los ligandos opioides. Los receptores opioides comparten una homología en su secuencia aminoacídica de aproximadamente un 60%, que es mayor en los segmentos transmembrana. La diversidad tiene lugar en los extremos amino y carboxilo terminales, así como en los lazos extracelulares (Chen et al., 1993), que cubren la cavidad formada por las regiones conservadas (hélices transmembrana).

Desde el punto de vista farmacológico, los receptores μ (MOR) presentan una alta afinidad por el agonista peptídico DAMGO, por la morfina y sus derivados, como la morfina-6- β -glucurónido, y por los antagonistas CTOP y naloxonacina, así como por las endorfinas, consideradas sus agonistas endógenos. Estudios farmacológicos sugieren

la existencia de subtipos de receptores μ (Pasternak and Wood, 1986): μ_1 y μ_2 , siendo éste último el que parece ser específico para la morfina, pero, al igual que en el caso de los subtipos del receptor κ , aún no existen compuestos selectivos que puedan ayudar en la tarea de su diferenciación.

Por su parte, los receptores opioides δ (DOR) tienen una alta afinidad por los agonistas DPDPE, DSLET, deltorfina II y por el antagonista naltrindol, compuestos que se unen con menor afinidad a los receptores κ y μ . Además, de acuerdo con estudios farmacológicos y de comportamiento, se ha propuesto la existencia de subtipos del receptor δ (Sofuoglu et al., 1991): el receptor δ_1 , que es activado selectivamente por DPDPE y bloqueado por el antagonista BNTX; y el receptor δ_2 es activado selectivamente por la deltorfina II y bloqueado por el antagonista NTB. Además, ambos subtipos son activados por los péptidos endógenos encefalinas y por la β -endorfina y bloqueados con alta afinidad por el antagonista naltrindol.

El receptor opioide κ (KOR) exhibe una alta afinidad por los agonistas U50,488 y U69,593 y por el antagonista nor-BNI. Estudios farmacológicos sugieren la posible existencia de tres subtipos de receptores κ (Clark et al., 1989); sin embargo, aún no se han diseñado compuestos κ -selectivos que verifiquen totalmente la existencia de subtipos farmacológicos para este receptor. La dinorfina es considerada su ligando endógeno.

Dada la alta homología que presenta el receptor ORL/NOP (*opioid receptor like*) con los miembros de la familia opioide se le consideró inicialmente como un miembro de esta familia, aunque los estudios farmacológicos realizados sobre este receptor pusieron de manifiesto que ORL no unía con gran afinidad ningún ligando opioide, agonista o antagonista. Estos estudios se completaron con diversos compuestos no

opioides como haloperidol, eleidosina, gallanina, idazosan, ketanserina, LSD (Lachowicz et al., 1995); fenciclidina, somatostatina, ibogaina (Mollereau et al., 1994), y se observó que ninguno de ellos presentaba afinidad por dicho receptor. Dado que aparentemente este receptor no tenía ligando propio en un principio se le denominó receptor huérfano. Posteriormente se descubrió su ligando endógeno, la nociceptina, que comparte una elevada homología con la dinorfina, el agonista endógeno del receptor opioide κ (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995).

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado la estrecha relación que existe entre la caracterización molecular y farmacológica de los receptores opioides descritos hasta el momento (MOR, DOR, KOR y ORL) de pez cebra y de mamíferos avalando así la idoneidad del pez cebra como modelo experimental para el estudio de los mecanismos que describen el dolor y la drogodependencia. En la figura 5 se muestra la filogenia de los receptores opioides del pez cebra, comparándolos con los receptores de humano, rata y ratón. Se puede observar una división inicial en la línea evolutiva que da lugar al receptor opioide ORL y a los receptores opioides clásicos MOR, DOR y KOR. Posteriormente el receptor kappa se separa de la línea evolutiva común y finalmente aparecen diferenciados los receptores mu y delta. La evolución de los receptores opioides en las especies analizadas, incluida el pez cebra, ocurre de manera paralela, y así, el receptor mu de pez cebra es homólogo al receptor mu de humano, rata y ratón, los receptores tipo delta de pez cebra son homólogos al receptor delta de las tres especies de mamífero analizadas, y lo mismo ocurre con los receptores kappa y ORL.

En concreto, en los últimos años se han clonado en nuestro laboratorio cinco receptores de pez cebra semejantes a los receptores opioides de mamíferos, a los que se ha denominado: ZFOR1 (del inglés, Zebrafish Opioid Receptor 1), actualmente llamado

ZfDOR1, que presenta homología con el receptor opioide delta de mamíferos (Barrallo et al., 1998a; Barrallo et al., 1998b; Rodriguez et al., 2000); ZFOR2 (actualmente ZfMOR), que presenta homología con el receptor opioide mu (Barrallo et al., 2000); ZFOR3 (actualmente ZfKOR), que presenta homología con el receptor opioide kappa (Alvarez et al., 2006); ZFOR4 (actualmente ZfDOR2), que es un duplicado de ZfDOR1 y, por ello, presenta mayor homología con el receptor opioide delta (Pinal-Seoane et al., 2006) y ZfORL, que presenta homología con el receptor ORL (Rivas-Boyero et al., 2011). El análisis de hidrofobicidad de las proteínas resultantes indica la presencia de siete posibles dominios transmembrana, lo que las incluye en la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GPCRs).

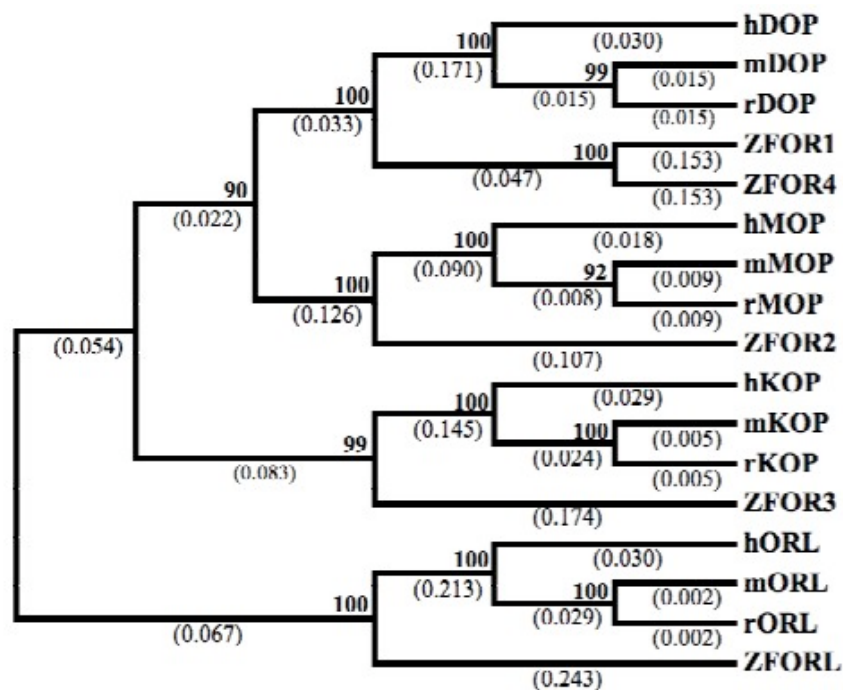


Figura 5. Filogenia de los receptores opioides del ser humano (h), la rata (r), el ratón (m) y el pez cebra (ZF). (Gonzalez-Nunez and Rodriguez, 2009; Herrero-Turrion and Rodriguez, 2008).

Con el objeto de profundizar en la funcionalidad del sistema opioide en el pez cebra también se han identificado los precursores de los ligandos endógenos opioides

correspondientes a dichos receptores, (Gonzalez Nunez et al., 2003; Gonzalez-Nunez et al., 2003a; Gonzalez-Nunez et al., 2003b; Gonzalez-Nunez et al., 2007a). Concretamente se han clonado dos genes que codifican para la proencefalina (PENK y PENK-like), dos genes que codifican para la proopiomelanocortina (POMC y POMC-like), un gen que codifica para la prodinorfina (PDYN) y un gen que codifica para la pronociceptina (PNOC). Además, se ha descubierto un nuevo péptido opioide exclusivo del pez cebra, denominado MEGY (Met-Enkephalin-Gly-Tyr) y que parece ser un ligando específico de los receptores opioides delta (Gonzalez-Nunez et al., 2005; Gonzalez-Nunez et al., 2007b).

I.3. OPIOIDES Y DESARROLLO

Las sustancias opioides son conocidas fundamentalmente por su actividad analgésica, así como por su capacidad de inducir tolerancia, dependencia y en algunas ocasiones, adicción, tras un consumo prolongado. Sin embargo, la existencia de varios subtipos farmacológicos de cada receptor opioide y la ausencia de caracterización genética que pudiera determinar si cada subtipo farmacológico procedía de un gen diferente, obligaron a la comunidad científica a abrir nuevas puertas en la investigación sobre la actividad del sistema opioide. A finales de los años 80 comenzaron a publicarse diversos estudios en los que se analizaba la expresión tanto de receptores opioides como de precursores de péptidos opioides endógenos durante el desarrollo de mamíferos, apuntando a la existencia de funciones específicas del sistema opioide endógeno en la formación de diversas estructuras del embrión, concretamente del Sistema Nervioso Central, en el que la presencia y actividad opioide es mayor y más relevante (Hauser et al., 1987; Hauser et al., 1989; Stiene-Martin et al., 1991). Una vez clonados los tres

genes que codifican para los tres receptores opioides clásicos, mu, delta y kappa, se comenzó a elucidar la actividad farmacológica y funcional de cada uno de estos receptores, y además de su capacidad analgésica, su posible implicación en distintos procesos que forman parte del desarrollo embrionario, como la proliferación celular, la neurogénesis, la diferenciación neuronal o la protección neuronal frente a diversos daños producidos por ausencia de oxígeno o por la presencia de alguna sustancia tóxica. En concreto, los receptores opioides mu y kappa potencian la neurogénesis (Kim et al., 2006), el receptor opioide kappa incrementa la tasa de proliferación celular cuando es activado por la morfina (Weber et al., 2008) y el receptor opioide delta interviene tanto en neurogénesis como en protección neuronal (Narita et al., 2006; Zhang et al., 2000). Además, la exposición embrionaria a sustancias opioides como la morfina, sobre todo en estadios tempranos del desarrollo, produce malformaciones del tubo neural, alteraciones de la motilidad y del comportamiento y a elevadas dosis, muerte neuronal, así como inhibición de crecimiento axonal (Berrios et al., 2008).

Por otro lado, a pesar de los esfuerzos realizados por comprender la actividad opioide durante el desarrollo y de qué manera puede afectar esta actividad a la vida adulta del individuo, se desconocen los mecanismos a través de los cuales el sistema opioide endógeno ejerce las funciones descritas.

I.4. SISTEMA DOPAMINERGICO

El sistema dopaminérgico es un sistema químico de gran importancia en la transmisión de impulsos en el cerebro cuya actividad está mediada por la producción de dopamina, un neurotransmisor producido fundamentalmente en la sustancia negra, pero

que también es liberado en el hipotálamo. La dopamina activa cinco tipos de receptores, denominados DRD1, DRD2, DRD3, DRD4 y DRD5 (Iversen et al., 2010).

El sistema dopaminérgico forma parte de dos rutas de información en el cerebro. Por un lado, está implicado en los procesos regulados por el sistema mesolímbico o circuito de recompensa, y por otro lado, controla los núcleos relacionados con la función motora, con el placer y la euforia, íntimamente relacionados con el circuito de recompensa. Ambos sistemas están diferenciados desde el punto de vista anatómico (Fig. 6), de manera que el circuito de recompensa se extiende desde el área tegmentaria ventral (VTA, *ventral tegmental area*) que proyecta las terminaciones nerviosas de manera ascendente al núcleo *accumbens*, cuyas neuronas proyectan a la amígdala, el hipocampo y finalmente se integra la información recibida en la corteza cerebral, concretamente en el lóbulo frontal, donde se localizan los centros neurocognitivos. La cascada de señalización dopaminérgica que regula la función motora, el placer y la euforia comienza en la sustancia negra y proyecta hacia el estriado (Fig. 6).

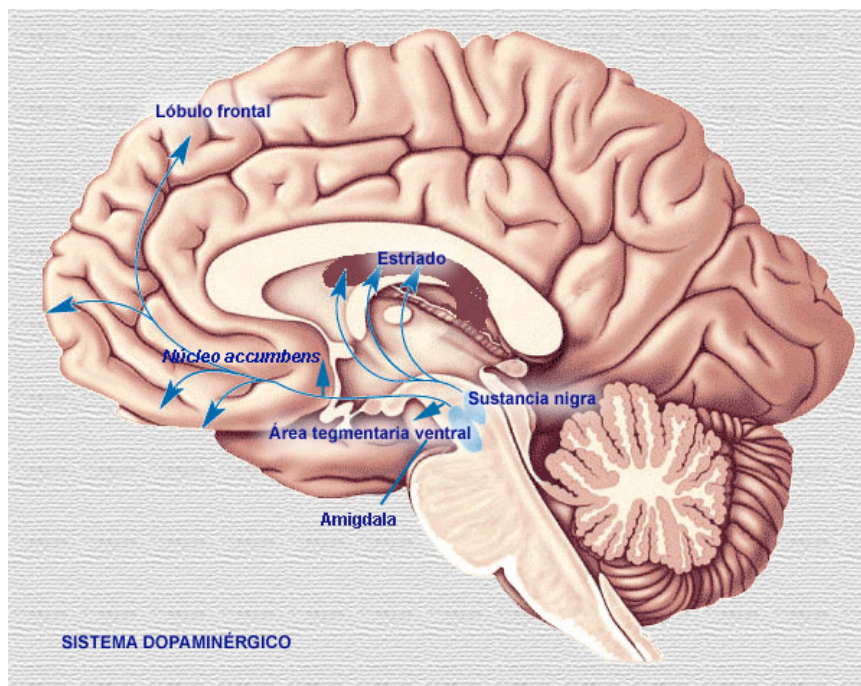


Figura 6. Representación del sistema dopaminérgico en el cerebro humano. Imagen obtenida de <http://www.iqb.es/neurologia/atlas/lewy/lewy08b.jpg>

El sistema dopaminérgico es el principal componente activo del desarrollo de los procesos que dan lugar a la adicción originada por el consumo prolongado de ciertas drogas, dada su implicación en el circuito de recompensa. En el caso de las sustancias opiáceas, es la interacción con sus receptores específicos, los receptores opioides, la responsable de los cambios producidos en el sistema dopaminérgico, mientras que otras drogas, como la cocaína o las anfetaminas, interaccionan directamente con este sistema, bien a través de su unión a los receptores dopaminérgicos, bien a través del bloqueo del transportador de la dopamina (para una revisión sobre este tema ver Bjorklund y Dunnett, 2007).

Cuando el organismo entra en contacto con una de las drogas mencionadas, las neuronas dopaminérgicas presinápticas comienzan a sintetizar y a liberar dopamina al espacio sináptico mediante unas señales específicas según la droga y su mecanismo de actuación. En un principio, esta dopamina es captada por el transportador de dopamina en la neurona postsináptica, para evitar que el incremento de la liberación de dopamina no sobre-estime a los receptores de la dopamina situados en la postsinapsis (revisado por (Cave and Baker, 2009). Si la liberación de dopamina se prolonga en el tiempo, el sistema se hace tolerante, de manera que la expresión del transportador de dopamina disminuye y como consecuencia, aumenta la concentración de dopamina en el espacio sináptico, que activa continuamente a sus receptores en la neurona postsináptica. La sobre-estimulación del sistema producida por el incremento de dopamina en el espacio sináptico llega a la corteza cerebral, alterando los centros del aprendizaje y la memoria, lo que da lugar a la aparición de dependencia. La inducción constante de estas alteraciones puede llegar a dañar gravemente estos centros neurocognitivos, y como consecuencia puede desarrollarse adicción (Seger, 2010).

En este sentido, el trabajo que estamos realizando puede aportar datos a la aplicación clínica, como por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Parkinson, originada la pérdida de neuronas dopaminérgicas, ya que como se ha mencionado anteriormente, el sistema dopaminérgico controla los centros motores. Además, la disminución de los niveles fisiológicos de dopamina en el espacio sináptico produce un aumento de la sensibilidad nociceptiva (hiperalgesia), uno de los síntomas que aparecen en los enfermos de Parkinson (Merims and Giladi, 2008).

Teniendo en consideración que el sistema dopaminérgico interviene en dos actividades íntimamente relacionadas con las sustancias opioides, el dolor y la adicción, es esencial profundizar en el conocimiento de los mecanismos que modulan este sistema y su relación con el sistema opioide.

I.5 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL A TRAVÉS DE MICRO RNAs

Los micro RNAs son pequeñas moléculas de RNA (22 nucleótidos aproximadamente) incluidas dentro de los RNAs no codificantes que actúan como reguladores de la transcripción (Pillai, 2005). Se encuentran en todos los seres vivos eucariotas. Desde el punto de vista genético los precursores de los micro RNAs, denominados pre-pro-miRNAs o pri-miRNAs se localizan bien en regiones intrónicas de otros genes, bien en regiones intergénicas. Los mecanismos de regulación que inician el procesamiento de las moléculas precursoras de los micro RNAs se desconocen en gran medida, aunque sí se tiene conocimiento de algunas señales que activan estos mecanismos.

El comienzo de la biogénesis del micro RNA maduro está marcado por la transcripción del pri-miRNA por parte de la RNA polimerasa II, que reconoce la

secuencia de DNA genómico situada en el extremo 5' (Fig. 7) (Bartel, 2004). Posteriormente, la ribonucleasa Droscha corta el pri-miRNA, dando lugar al pre-miRNA, que adquiere la forma de “pinza” que caracteriza la estructura de esta molécula, y mediante una exportina 5 el pre-miRNA se traslada al citoplasma, donde tiene lugar el procesamiento posterior. La RNAsa III denominada Dicer corta la molécula de pre-miRNA, que origina un dos moléculas de miRNA de 22 nucleótidos aproximadamente, en forma de dúplex. Una de las moléculas de miRNA maduras se incorpora al complejo RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*), que al unirse a la región diana correspondiente del mRNA cuya expresión regula produce la rotura o degradación de dicho mRNA. Al contrario que en el caso de los siRNAs, los miRNAs no hibridan de manera perfecta con sus regiones diana, sino que el acoplamiento es parcial, lo que dificulta la predicción de posibles genes diana.

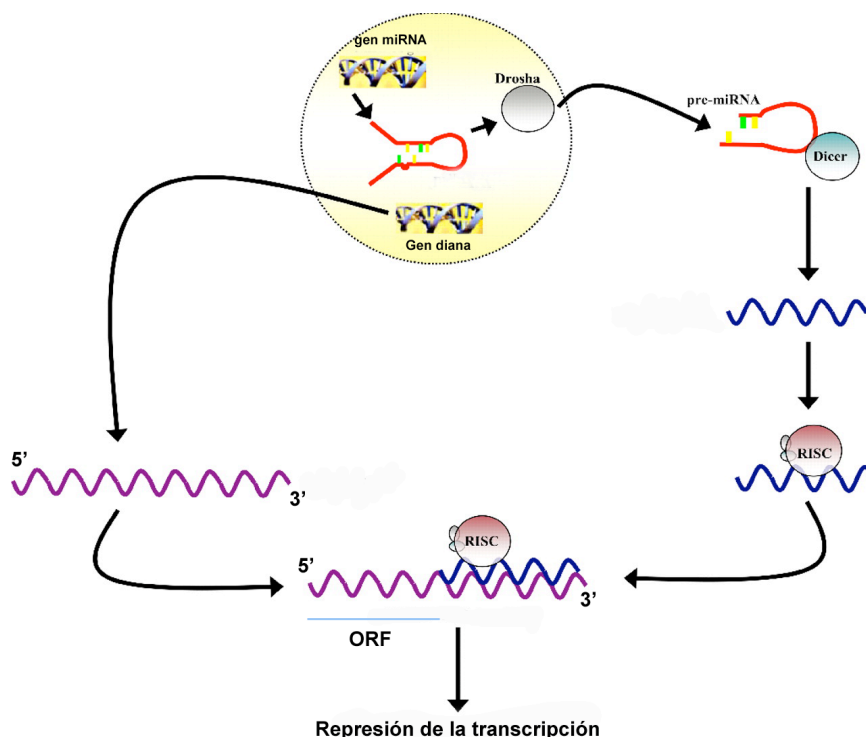


Figura 7. Esquema que representa la biogénesis del micro RNA desde la actividad de la ribonucleasa Droscha a partir del gen en el que se encuentra el micro RNA, la función RNasa del enzima Dicer y el posterior reconocimiento por el complejo RISC de la región diana del micro RNA, que generalmente se encuentra en el extremo 3'UTR del mRNA cuya transcripción regula.

En algunos casos, su actividad está referida a procesos que tienen lugar en estadios tempranos del desarrollo embrionario, como es el caso del miRNA-460, cuya función es eliminar los mRNAs de origen materno de manera que el desarrollo continúe con normalidad (Giraldez et al., 2006). Se ha demostrado también la implicación de otros miRNAs, entre los que se encuentra el miRNA-34 y el miRNA-190 (Schratt et al., 2006; Zheng et al., 2010), en la diferenciación del Sistema Nervioso Central. Además, la mayoría de micro RNAs están implicados en la proliferación celular, de manera que impiden la transcripción de genes apoptóticos o de genes que favorecen la diferenciación celular, en definitiva, de genes que inhiben la proliferación. Por ello se considera ampliamente que los miRNAs funcionan como agentes antiapoptóticos, por lo que han adquirido gran relevancia. Numerosos estudios han demostrado que en diversos tumores determinados miRNAs están sobreexpresados, promoviendo de esta manera el crecimiento y difusión de las células cancerígenas por el organismo, promoviendo las metástasis.

En este trabajo de Tesis Doctoral nos hemos centrado en el estudio del miRNA-133b (Fig. 8A). Hasta el momento sólo se conoce el mecanismo de actuación del miRNA-133b a través de su función sobre el factor de transcripción Pitx3, que a su vez activa la transcripción de genes imprescindibles en la diferenciación de neuronas a fenotipo dopaminérgico, como la tirosina-hidroxilasa (TH) y el receptor dopaminérgico tipo 1 (DRD1) (Kim et al., 2007). La sobreexpresión del miRNA-133b inhibe dicha diferenciación impidiendo la transcripción de Pitx3, y como consecuencia, de TH y DRD1 (Fig 8B).

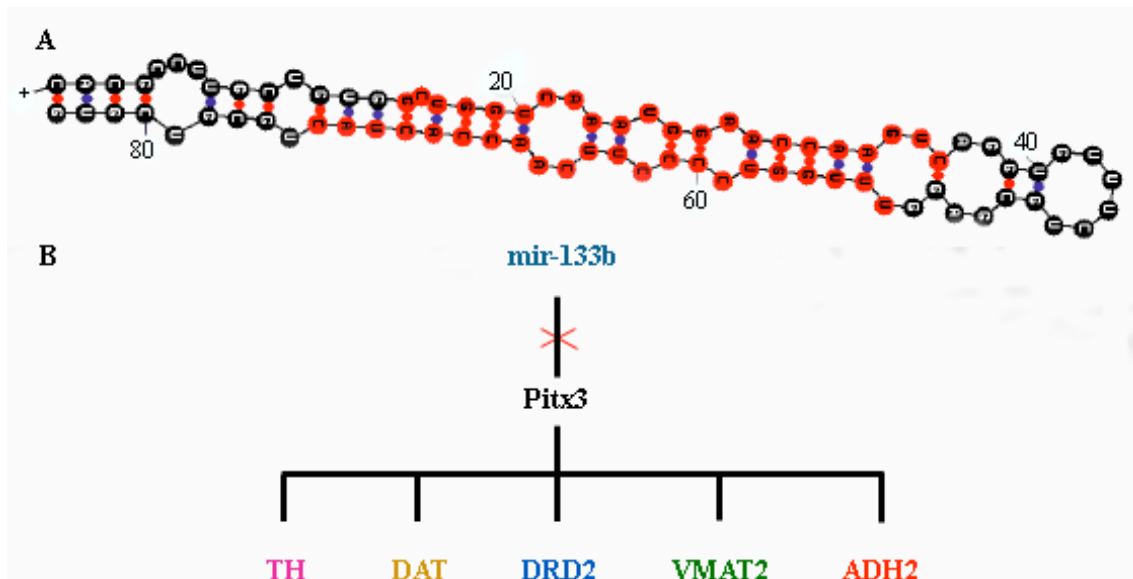


Figura 8. A) Secuencia del dúplex del miR-133b, constituido por 84 ribonucleótidos. El micro RNA maduro aparece en color rojo. B) Mecanismo de acción del miR-133b, que inhibe la expresión del factor de transcripción Pitx3, cuya función es activar la expresión de la tirosina-hidroxilasa (TH), el transportador de la dopamina (DAT), el receptor dopaminérgico DRD2, el transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2) y la aldehído deshidrogenasa 2 (ADH2). Estos genes determinan la diferenciación neuronal a fenotipo dopaminérgico, de manera que cuando se expresa el miR-133b, se inhibe la expresión de estos genes, y por tanto la diferenciación dopaminérgica.

I.6. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO: WNT1 Y NOTCH

Durante el desarrollo embrionario, una vez acabado el periodo de división celular indiferenciada, comienza el proceso de subdivisión y diferenciación de las estructuras primarias de las cuales derivan todos los órganos y tejidos del organismo adulto: ectodermo, mesodermo y endodermo (Gilbert, 2005). El ectodermo, además de dar lugar a la piel y a los tejidos que recubren y protegen los órganos, constituye asimismo el tubo neural, a partir del cual se forma el Sistema Nervioso tanto central como periférico. La subdivisión y diferenciación del Sistema Nervioso Central está regulada por una serie de morfógenos, cuyas diferencias de concentración activan

distintas cascadas de señalización intra e intercelulares que determinan los procesos de diferenciación neural.

Dada la implicación de los receptores opioides en proliferación celular, neurogénesis y diferenciación neuronal, es probable que de alguna manera el sistema opioide esté relacionado con ciertos morfógenos y que a través de ellos participen activamente en estos procesos. Por ello hemos considerado el estudio de la interacción del sistema opioide con los denominados genes del desarrollo (del inglés *developmental genes*), concretamente con Wnt1 y Notch, que regulan directamente la proliferación celular y la diferenciación neuronal respectivamente. Además, ambas cascadas de señalización parecen interaccionar para llevar a cabo su función como reguladores de la diferenciación de algunos tipos celulares, como las células dendríticas (Cheng et al., 2010), lo que podría ocurrir en la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas, que como se ha mencionado anteriormente, están íntimamente relacionadas con los efectos que la activación del sistema opioide produce en el Sistema Nervioso Central.

I. 6-1. *Wnt1*

Wnt1 pertenece a la familia de los genes *wingless*, descritos por primera vez en la mosca *Drosophila*, y está muy conservado desde el punto de vista evolutivo. También es considerado un proto-oncogen por su capacidad de incrementar la tasa de proliferación celular (McMahon y Moon, 1989). Al igual que el resto de genes pertenecientes a la familia *wingless*, Wnt1 ejerce su actividad mediante su unión a un receptor de la familia *Frizzled*, aunque no existen ligandos específicos para cada receptor de este tipo. La unión de una proteína Wnt a su receptor puede desencadenar dos tipos de señalización intracelular (Fig. 9): la ruta canónica, en la que está implicada la β -catenina, y la ruta no canónica, mediada por la interacción del receptor *Frizzled* con

una proteína G diferente dependiendo de la proteína Wnt que active al receptor (revisado por (Montcouquiol et al., 2006). Cada ruta activa la transcripción de genes determinados, según la función concreta. La ruta canónica está implicada en la subdivisión del Sistema Nervioso Central y en la especificación de los precursores a los diferentes tipos neuronales. Por otro lado, la ruta no canónica está empezando a adquirir importancia dado el control que ejerce sobre la proliferación celular, así como el establecimiento de polaridad axial y la migración neuronal.

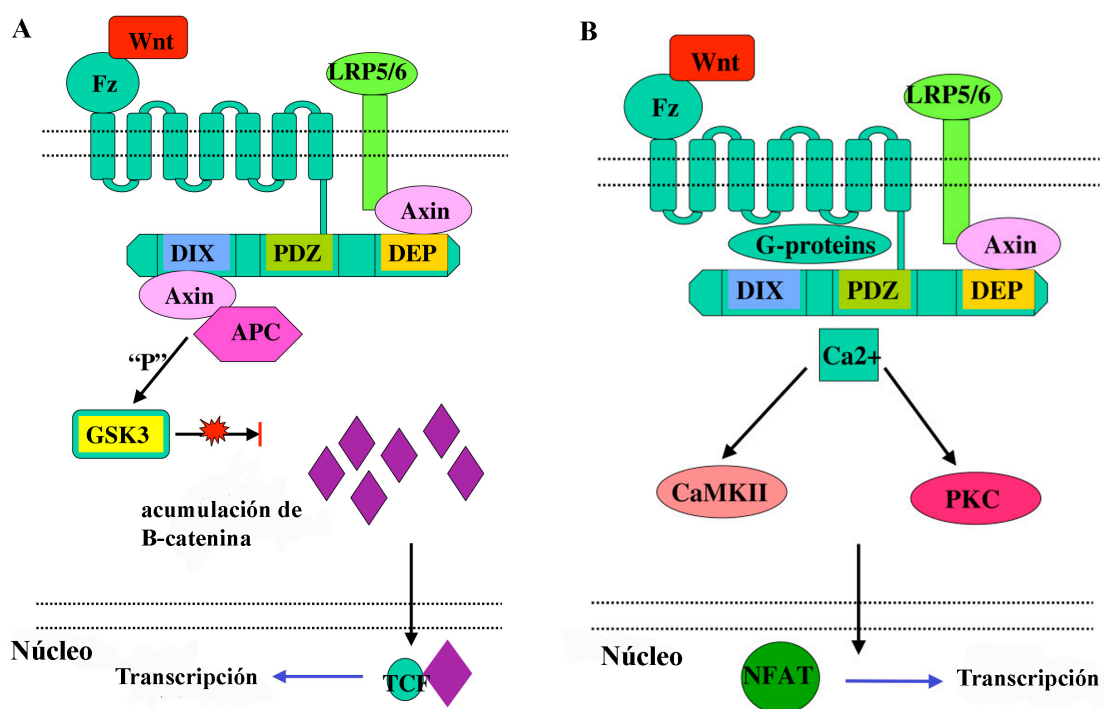


Figura 9. A) Ruta canónica de Wnt mediada por la β -catenina. B) Ruta no canónica de Wnt, que activa proteínas G, y como consecuencia se produce un aumento de calcio intracelular, que a su vez activa la protein-quinasa C (PKC), uno de los sistemas activados por la unión de ligandos a los receptores opioides. Imágenes obtenidas de <http://respiratory-research.com/content/7/1/15/figure>.

I. 6-2. Notch

La cascada de señalización de Notch constituye unos de los mecanismos más importantes en la determinación de los diferentes tipos neuronales del Sistema Nervioso

Central. Está muy conservada en la evolución, al igual que la mayoría de los genes implicados en el desarrollo embrionario. El receptor Notch es una proteína transmembrana de cuatro dominios: dos dominios extracelulares, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Este receptor es activado por dos tipos de ligandos, Delta y Serrate, que a diferencia de los ligandos de otros sistemas, como el sistema opioide, son proteínas transmembrana localizadas en la membrana plasmática de las células que se van a diferenciar (revisado por (Cau y Blader, 2009) (Fig. 10). Cuando uno de estos ligandos se une a Notch, sus regiones extracelulares se separan de la región transmembrana, y la región intracelular se transloca al núcleo, de manera que se activa una cascada intracelular que al llegar al núcleo favorece la transcripción de determinados genes que impiden la diferenciación de la célula que expresa Notch. Este mecanismo de diferenciación se denomina de “decisión binaria”, es decir, o se diferencia a un fenotipo concreto, o no se diferencia, aunque en estadios o etapas posteriores, puede hacerlo. En este sentido, recientemente se ha descubierto que la señalización de Notch, a través de sus ligandos Delta, interviene tanto en la recuperación de neuronas dopaminérgicas que han sido dañadas (Androutsellis-Theotokis et al., 2009) como en su diferenciación en el mesencéfalo a partir de precursores neurales (Bauer et al., 2008). La posible implicación de Notch y el sistema opioide en la diferenciación y protección del sistema dopaminérgico pone de manifiesto la importancia del estudio de una posible interacción entre ambas rutas con el objeto de profundizar en las funciones del sistema opioide durante el desarrollo y sus efectos en el animal adulto.

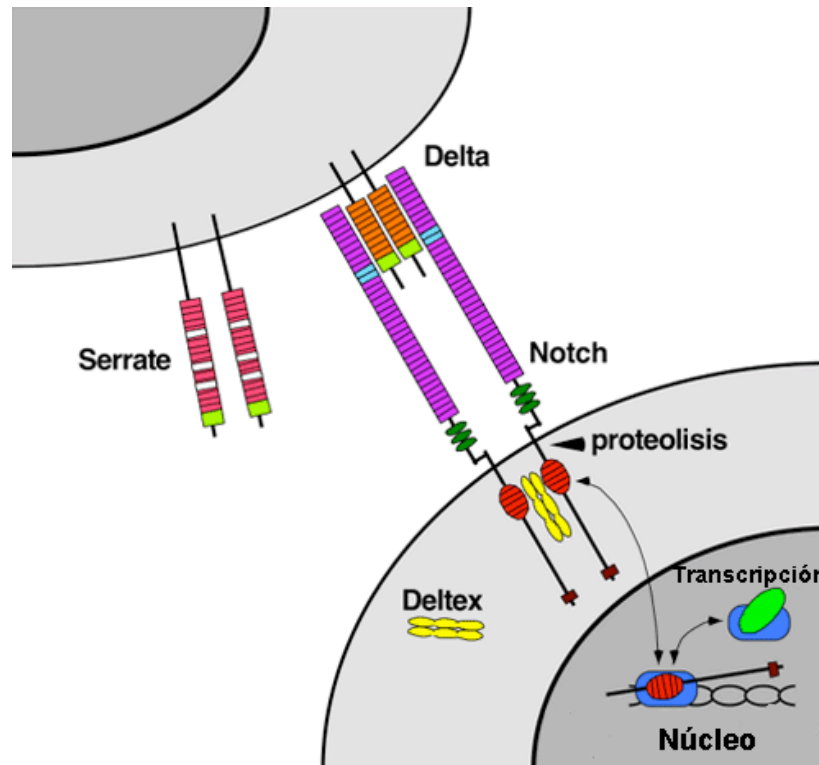


Figura 10. Mecanismo de acción de Notch. Imagen obtenida de <http://en.academic.ru/pictures/enwiki/78/Notchccr.gif>

I.7. EL PEZ CEBRA COMO MODELO EXPERIMENTAL

El pez cebra (*Danio rerio*, Fig.11), un teleósteo originario del río Ganges, se utiliza como modelo experimental para estudiar el desarrollo embrionario de los vertebrados ya que presenta una serie de ventajas sobre otros organismos que son utilizados como modelos experimentales, siendo relativamente fácil el manejo de sus embriones y la realización de sondeos genéticos que revelan las etapas y mecanismos de la embriogénesis.

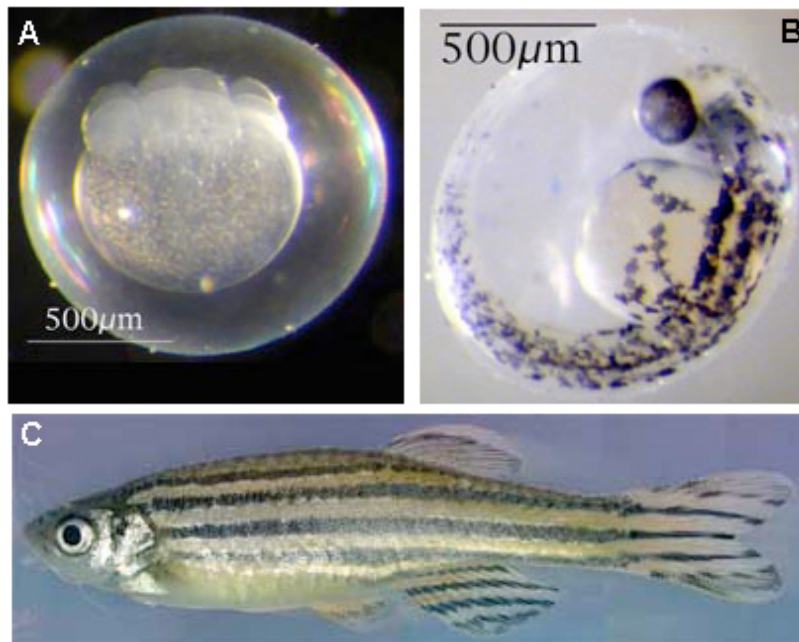


Figura 11. Fotografías del pez cebra en distintas etapas del desarrollo, concretamente a 1.5 hpf (A), a las 48 hpf (B) y una hembra adulta (C).

Hace un tiempo se empezaron a aplicar los sondeos genéticos en el pez cebra para el estudio de enfermedades humanas y los resultados son ciertamente alentadores: determinadas mutaciones provocadas en el pez cebra mimetizan el fenotipo descrito en varios desórdenes que afectan al ser humano (Dooley y Zon, 2000). Por ejemplo, algunas de las mutaciones observadas afectan al desarrollo normal del corazón alterando su contractilidad pero sin modificar su morfología, de manera que imita la cardiomiopatía dilatada (Xu et al., 2002). También se ha logrado obtener fenotipos que se corresponden con los producidos por arritmias (Rottbauer et al., 2001), enfermedades cardíacas congénitas (Horne-Badovinac et al., 2001), enfermedades vasculares como la arteriosclerosis o isquemia (para lo que se utilizaron embriones en el estadio de 24 horas post-fertilización, (Padilla y Roth, 2001), enfermedades renales como el fallo renal crónico o la enfermedad poliquística (el pez cebra presenta una ventaja adicional en este caso ya que después del desarrollo del riñón sigue manteniendo el pronefros),

osteoporosis y enfermedades óseas congénitas, Parkinson, Alzheimer, sordera, diabetes y cirrosis (Shin y Fishman, 2002). Además se ha estudiado el desarrollo del sistema inmune aplicando asimismo los sondeos genéticos y creando individuos transgénicos que mimetizan las leucemias que afectan tanto a linfocitos B como a linfocitos C (Trede et al., 2004).

También se ha señalado que el pez cebra es un sistema adecuado para determinar la funcionalidad de proteínas codificadas por el genoma humano, así como para estudiar el desarrollo del sistema nervioso e identificar anomalías metabólicas. Debido a su capacidad para incorporar moléculas disueltas en agua, el pez cebra también puede emplearse para estudiar las interacciones entre el genoma y el medio ambiente (Fishman, 2001). Asimismo, en los últimos años el pez cebra está siendo utilizado como organismo modelo para el descubrimiento y validación de nuevas dianas farmacológicas, así como en estudios toxicológicos y en la búsqueda de nuevas drogas (Goldsmith, 2004).

Varios autores ya han propuesto al pez cebra como un modelo para el análisis biológico de los efectos de diversas drogas como el alcohol (Dlugos y Rabin; Gerlai et al., 2000) y la cocaína (Darland y Dowling, 2001), obteniendo resultados parecidos a los encontrados en ratones. Anichtchik y colaboradores (Anichtchik et al., 2004) han demostrado que la administración de neurotoxinas catecolaminérgicas al pez cebra produce alteraciones neuroquímicas y comportamentales. Estos autores postulan que el pez cebra podría emplearse en el análisis de fármacos que actúan sobre el sistema dopaminérgico, especialmente en la identificación de nuevos genes implicados en el proceso de neurotoxicidad. Además, el pez cebra es un organismo en el que se pueden realizar análisis químicos de moléculas de bajo peso molecular, evitando el efecto materno que puede alterar los resultados si el mismo análisis se realiza sobre animales

con desarrollo intrauterino (Pichler et al., 2003). Por ello, este modelo es adecuado para realizar ensayos preclínicos frente a agentes tóxicos, y puesto que los embriones modifican su comportamiento tras la ingesta de alcohol o cocaína, el pez cebra podría ser utilizado como modelo para el estudio del fenómeno de adicción.

Por otra parte, un aspecto clave para poder utilizar al pez cebra como un modelo en el estudio del dolor y poder ensayar nuevos fármacos analgésicos, es conocer si los peces son capaces de sentir dolor. Un estudio con la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) ha demostrado que los peces tratados con estímulos dolorosos responden con determinados comportamientos, que no pueden catalogarse como simples reflejos sino más bien como equivalentes a los observados en mamíferos tras la aplicación de estímulos dolorosos. Además, en estos estudios la morfina posee un efecto analgésico al reducir los comportamientos relacionados con el estímulo doloroso (Sneddon, 2003); Braithwaite, 2010).

Existen controversias sobre los mecanismos que subyacen a la aparición y el desarrollo de tolerancia y dependencia a drogas de abuso. Parece claro que es necesario desarrollar nuevos modelos que aporten información sobre estos desafortunados efectos secundarios desde el punto de vista molecular, estructural, celular y de comportamiento. En este sentido se han realizado estudios sobre los efectos de la adicción a diferentes drogas utilizando el pez cebra como sistema modelo (Ninkovic y Bally-Cuif, 2006).

Finalmente, al margen de la importancia que en sí tiene el pez cebra como modelo experimental para el estudio de los sistemas biológicos en vertebrados, otros modelos experimentales no permiten abarcar tantas técnicas como muchas veces requiere la investigación básica. En este sentido, el pez cebra puede ser un buen modelo para el estudio de los agentes opioides, ya que actualmente, 36 años después del

descubrimiento de los opioides endógenos, aún no se conoce con exactitud su función y, sobre todo, no se han podido establecer con certeza absoluta los mecanismos endógenos que describen su funcionamiento, ni se ha podido definir la forma de controlar los efectos secundarios producidos por éstos, como son la tolerancia y dependencia a las drogas.

En concreto, es enorme la controversia existente en cuanto a los mecanismos intracelulares que hacen posible, por un lado, el control del dolor crónico y por otro, la producción de dependencia de la droga utilizada como agente analgésico (Corbett et al., 2006). Hasta el momento, los estudios realizados con otros modelos experimentales no han resuelto muchas de las discrepancias existentes.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La búsqueda de un remedio definitivo para aliviar el dolor ha sido una constante en la historia de la Medicina, debido no sólo a su componente fisiológico como señal de alerta, sino también porque supone una experiencia emocional desagradable para quien lo padece. Sin embargo, todavía hoy la industria farmacéutica no ha podido diseñar el fármaco ideal para controlar el dolor crónico; aún no contamos con la droga ó medicamento, que al aliviar la sensación dolorosa no produzca efectos secundarios adversos. En gran medida, la lentitud con la que aparecen nuevos fármacos analgésicos se debe, sin lugar a dudas, al hecho de que los mecanismos endógenos que describen la acción de un agente concreto son, en su mayoría, desconocidos. El gran *puzzle* que se nos presenta cuando un agonista opiáceo se une a un receptor, desencadenando una enorme cascada de acontecimientos bioquímicos a nivel celular, hace que la tarea de diseñar el fármaco apropiado sea sumamente difícil y requiera de la unión de varias disciplinas, a nivel experimental, para aportar luz, y así poder encontrar la mejor forma de unir las piezas, que aún hoy, no sabemos dónde, ni cómo encajar. El empleo del pez cebra como modelo experimental supone una valiosa herramienta para profundizar en los mecanismos intracelulares y bioquímicos que nuestro Sistema Nervioso utiliza ante fenómenos tan preocupantes como el dolor o la adicción. Teniendo estos hechos en consideración nos planteamos la siguiente hipótesis: el estudio de nuevas funciones del sistema opioide durante el desarrollo embrionario lleva al descubrimiento de nuevos mecanismos a través de los cuales se profundiza en la actividad funcional de este sistema y poder así evitar los efectos adversos que provoca su continua activación.

Para verificar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar la expresión y distribución de los receptores opioides ZfDOR1, ZfDOR2, ZfMOR, ZfKOR y ZfORL durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
2. Analizar el efecto de la activación del sistema opioide por la morfina en embriones de pez cebra.
3. Estudiar la implicación del sistema opioide en la regulación de la proliferación, neurogénesis y protección neuronal.
4. Analizar de posibles mecanismos de regulación transcripcional controlados por el sistema opioide.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. 1. MANTENIMIENTO Y CRIA DE EMBRIONES

La obtención inicial de embriones de pez cebra se realizó cruzando individuos reproductores procedentes de la Universidad de Oregón (The Zebrafish International Resource Center), Estados Unidos. Estos peces adultos pertenecen a la estirpe AB. El hecho de trabajar con una estirpe determinada presenta una serie de ventajas sobre los estudios realizados con peces cebra *wild type* o salvajes, como la homogeneidad obtenida en los resultados de los experimentos o el control de mutaciones. La estirpe AB está libre de mutaciones letales y es la más utilizada en los laboratorios que trabajan con este animal como modelo experimental. Los adultos se mantienen en un sistema de peceras (25 L) diseñado por Zebrafish Biolabs (Madrid) con filtro químico a base de carbón activo (Fig. 12). Las larvas y los juveniles se mantienen en peceras de menor tamaño (6 L) con una bomba de aire y un calentador que evita variaciones de la temperatura óptima del agua (25-26 °C). Para mantener la calidad idónea del agua se realizan constantes mediciones de parámetros como el pH (el valor óptimo es 6,5), la concentración de nitritos y de nitratos (cuanto más próximo a 0 g/L, mejor calidad del agua) y la concentración de cloro (valor óptimo cercano a 0 g/L).

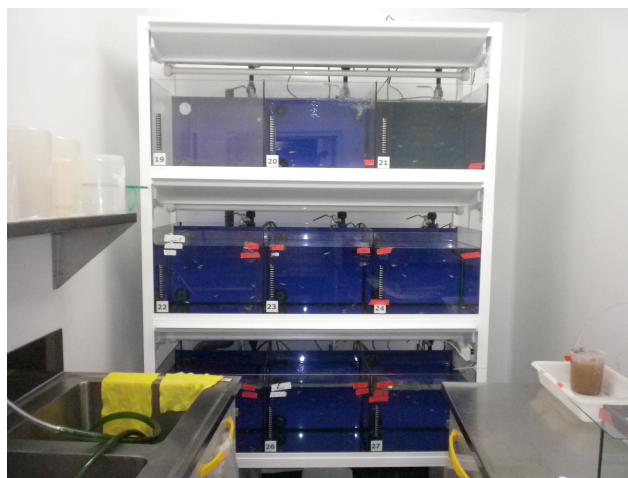


Figura 12. Sistema de peceras para peces adultos utilizados en este trabajo. Los peces adultos están distribuidos en las peceras por fecha de nacimiento y sexo.

Para este trabajo hemos establecido un sistema de cría natural en parideras con una hembra y dos machos para que la fecundación de los huevos sea más eficaz. La cría natural está basada en el fotoperiodo de los animales de manera que la puesta se realiza durante la primera exposición del día a la luz, lo que nos permite controlarla. Alternamos 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, siguiendo lo descrito por Westerfield, 1995. El primer estímulo luminoso tras el ciclo de oscuridad desencadena la liberación de los óvulos por parte de las hembras y de espermatozoides por parte de los machos. Recogemos los embriones en un tamiz y los depositamos posteriormente en una placa Petri con agua destilada y sales Instant Ocean (0,3 g/5 L de agua) de manera que haya pocos embriones por placa para que crezcan mejor. Posteriormente eliminamos los huevos que no se hayan fecundado porque provocan la muerte de los que estén en su proximidad. Mantenemos los embriones y las larvas de los primeros estadios (Fig. 13) en una incubadora a 28,5 °C (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002), la temperatura establecida para su correcto desarrollo.



Figura 13. Incubadora Memmert en la que se mantuvieron los embriones de pez cebra a 28,5 °C hasta su sacrificio o hasta la eclosión.

III. 2. EXPOSICIÓN DE EMBRIONES DE PEZ CEBRA A DIFERENTES SUSTANCIAS

A lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral, hemos empleado diversas sustancias con el objeto de estudiar tanto su efecto sobre la expresión de los receptores opioides, como los cambios que estas sustancias producen a nivel celular y neuronal en el Sistema Nervioso Central de los embriones de pez cebra. Las concentraciones y tiempos de exposición de cada sustancia se especifican a continuación:

Sustancia	Concentración*	Edad de exposición**
Morfina	10 nM	5 hpf
Naloxona	1 μ M	3 hpf
Nociceptina	10 nM	5 hpf
Nocistatina	1 μ M	3 hpf
MEGY	10 nM	5 hpf
SNC80	10 nM	5 hpf
Glutamato	1 μ M	5 hpf

* Las concentraciones de las distintas sustancias empleadas fueron seleccionadas tras realizar estudios concentración-efecto, de manera que se eligieron aquellas concentraciones que producían mayor efecto sobre lo que se quería estudiar en cada momento, y la menor tasa de muerte embrionaria. Empíricamente se establece que se ha de utilizar una concentración de antagonista que sea como mínimo 10 veces mayor a la del agonista.

**A excepción de los antagonistas naloxona y nocistatina, las drogas expuestas en la tabla fueron diluidas en el medio embrionario a las 5 hpf, una vez finalizado el periodo crítico del desarrollo. Los antagonistas naloxona y nocistatina se utilizaron dos horas antes que los agonistas, es decir, a partir de las 3 hpf, con el fin de que se unan a sus receptores específicos y bloqueen la unión de los agonistas a estos receptores.

Hasta el momento, la morfina es el agonista opioide por excelencia, y el analgésico más utilizado. Se une a los receptores opioides clásicos mu, delta y kappa,

aunque tiene mayor afinidad por el receptor opioide μ , característica conservada en el pez cebra (de Velasco et al., 2009; Gonzalez-Nunez et al., 2006). Por ello hemos empleado la morfina en nuestros estudios de actividad opioide durante el desarrollo y así poder determinar algunas de las funciones que el sistema opioide tiene en esta etapa, como su implicación en proliferación, diferenciación neuronal o protección neuronal.

La naloxona es el principal antagonista opioide, por lo que es el utilizado generalmente, incluido nuestro caso, para establecer si el efecto que produce un agonista opioide, implica la actividad de los receptores opiodes.

Con el fin de profundizar en la expresión receptor ORL de pez cebra durante el desarrollo embrionario, hemos empleado la nociceptina, su agonista endógeno, y la nocistatina, un antagonista de este receptor ampliamente utilizado, y así analizar los cambios en la expresión del receptor que produce la exposición a estas sustancias, por separado y simultáneamente.

MEGY (Met-Enkephalin-Gly-Tyr) y SNC80 ((+)-4-[(α R)- α -((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethyl benzamide) pertenecen a la familia de agonistas de los receptores opioides tipo delta, aunque el primero es un péptido endógeno específico del pez cebra, y el segundo es un compuesto sintético que apenas tiene afinidad por los receptores opioides delta del pez cebra (Pinal-Seoane et al., 2006).

El glutamato es un neurotransmisor que se encuentra presente de manera fisiológica en el Sistema Nervioso Central de vertebrados. Sin embargo, se utiliza con frecuencia como agente tóxico, ya que una exposición a elevadas concentraciones de glutamato produce muerte neuronal (Choi, 1988). En este proyecto hemos utilizado el glutamato en ensayos de neuroprotección *in vivo* en embriones sacrificados a las 24 hpf,

ya que en este estadio se han empezado a diferenciar los primeros tipos neuronales, como por ejemplo las motoneuronas.

III. 3. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Los embriones en los distintos estadios son conservados en 1 ml de Trizol (TRIZOL® Life Technologies), por cada 50-100 mg de tejido, a -80°C para evitar que el RNA se degrade.

El homogeneizado se realiza utilizando un Polytron y manteniendo la muestra en hielo para evitar que el aumento de temperatura provocado por el calentamiento del aparato degrade el RNA. Una vez homogeneizada la muestra se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir una completa disociación de los complejos nucleoprotéicos. Se añaden 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol agitando fuertemente los tubos con un vortex para mezclar ambos líquidos durante 15 segundos. Se dejan reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifugan 15 minutos a $12000 \times g$ y a 4°C . Tras la centrifugación la solución se separa en tres fases: en la inferior o fase orgánica, de color rosado, permanecen el DNA genómico y las proteínas; la interfase, en la que quedan componentes lipídicos y la fase superior acuosa, en la que se encuentra exclusivamente el RNA.

La fase acuosa se transfiere a otro tubo para precipitar el RNA, proceso que se realiza añadiendo isopropanol (0,5 ml por ml inicial de Trizol). Se incuban las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se centrifugan a $12000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . El RNA precipitado forma un *pellet* de consistencia tipo gel transparente, se lava con etanol al 75% (1 ml etanol por ml de Trizol) y se centrifuga a $7500 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . Se elimina el sobrenadante y se deja secar para que

el pellet no contenga restos de etanol. Por último se resuspende en agua libre de RNasas.

III. 4. SINTESIS DE cDNA

La síntesis de cDNA se lleva a cabo con el kit de *Invitrogen NCode™ miRNA First-Strand cDNA synthesis*, que permite la síntesis de cDNA no sólo a partir de RNA mensajero, sino también a partir de micro RNA. Inicialmente se incuba durante 15 minutos a 37 °C una mezcla formada por 3 µl de RNA total, 5 µl de tampón de síntesis, 2,5 µl de cloruro de magnesio, 1 µl de ATP, 0,5 µl de polimerasa A y 13 µl de agua libre de RNasas, hasta un volumen final de 25 µl. Posteriormente se añaden 4 µl de la reacción anterior a 3 µl de oligonucleótido universal que anilla también con micro RNAs y 1 µl de tampón de hibridación, y se deja incubar 5 minutos a 65 °C. Una vez finalizada esta reacción, se añaden 10 µl de tampón de extensión y 2 µl de retrotranscriptasa y se deja incubar durante 50 minutos a 50 °C. Por último, se eleva la temperatura de la reacción a 80 °C durante 5 minutos para inactivar los enzimas, que pueden inhibir los procesos posteriores a los que se sometan las muestras.

III. 5. PCR CUANTITATIVA (qPCR) ABSOLUTA

Para la detección de la amplificación tanto de los receptores opioides como del micro RNA 133b y de sus genes diana Pitx3, TH y DAT hemos utilizado el fluoróforo SYBR®Green (Fig. 14), un agente intercalante que emite fluorescencia cuando se une al DNA de doble cadena mediante FRET (transferencia de energía fluorescente de resonancia, Fig.15). Empleamos β-actina y EF1α como su controles de referencia

porque son genes constitutivos, es decir, se expresan por igual en todas las células y en todos los estadios.

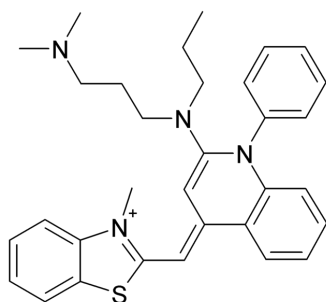


Figura 14. Estructura Química del SYBR-green.

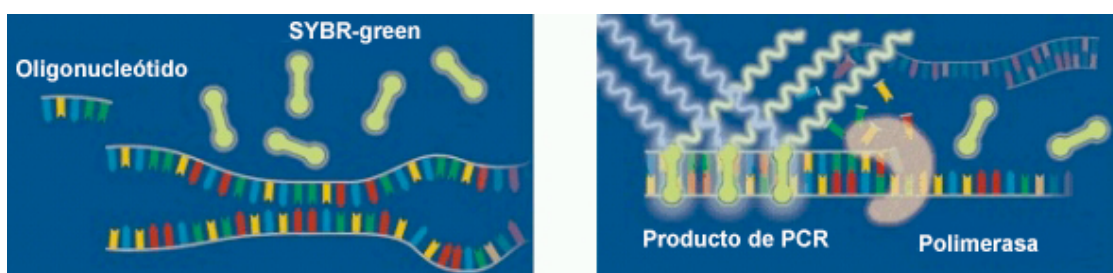


Figura 15. Mecanismo de detección de producto de PCR mediante la utilización de SYBR-green. Las moléculas de SYBR-green en disolución no emiten fluorescencia. A medida que se va amplificando el producto de PCR, se van intercalando las moléculas de este reactivo en la doble cadena de DNA, y entonces son capaces de absorber una determinada longitud de onda, y emitir luz a una longitud de onda menor. De esta manera, a medida que aumenta la concentración de producto de PCR, aumenta la cantidad de moléculas de SYBR-green emisoras de luz, y por tanto, se produce un incremento en la fluorescencia total detectada por el termociclador.

El SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems) contiene la DNA polimerasa AmpliTaq Gold y los nucleótidos, de manera que sólo hay que añadir los oligonucleótidos o cebadores, que determinan la secuencia a amplificar, el cDNA (en este trabajo hemos empleado 25 ng) y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final de 20 µl. Para la realización de las qPCRs en este proyecto de Tesis Doctoral se han empleado los siguientes oligonucleótidos:

Gen	Secuencia F*	Gen	Secuencia R*
ZfMOR	ACGAGCTGTGCAAGATTGTG	ZfMOR	CCGATTGCAGATGAAAGGAT
ZfDOR1	ACTATGATGAGCGTGGACCGTT	ZfDOR1	GCGGAGGAGAGGATCCAGAT
ZfDOR2	CAGGATCATCAGGCCGTAGC	ZfDOR2	CCGATTGCAGATGAAAGGAT
ZfKOR	CATGTTACCCAGTATCTTCACTTTGA	ZfKOR	ACACTCTGTCGTGCCATTGTTC
ZfORL	GTGGGAAACTGCTTGGTCAT	ZfORL	CCAGAAGCCCAGAAACACAT
miR-133b	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTA	Oligo Universa l	Kit de <i>NCode™ miRNA First-Strand cDNA synthesis</i>
Pitx3	GACAACAGTGACACAGAGAAGT	Pitx3	TGTCGGGATAACGGTTTCTC
TH	TTTGAAGAGAAGTGCAGAGGAT	TH	TCAGTAAATCCTGGGTGATCC
DAT	AGACATCTGGGAAGGTGGTG	DAT	ACCTGAGCAT CATAACAGGCG
β-actina	ACACGACCCAGAGCATCAGGGAG	β-actina	CCTCTCTTGCTCTGAGCCTCA
EF1α	GTACTIONTCTCAGGCTGACTGTG	EF1α	ACGATCAGCTGTTTCACTCC

*F y R significan *forward* y *reverse* en terminología anglosajona

Programa que se ha empleado en el termociclador:

- activación del enzima 10 minutos a 95 °C
- 36 ciclos que alternan 3 segundos de desnaturalización a 95 °C y 30 segundos de anillamiento y extensión a la temperatura de anillamiento de los oligonucleotidos utilizados: 55 °C para ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2, ZfKOR, ZfORL y β-actina, y 60 °C para miR-133b, Pitx3, TH, DAT y EF1α.

Una vez finalizado el proceso de amplificación, los resultados obtenidos son normalizados por el *software* AB7300 (Applied Biosystems), utilizando la detección el fluorocromo ROX como detector de fondo.

Para cuantificar el resultado es necesario realizar una curva estándar. Para ello se amplifica mediante PCR básica la región que se desea amplificar de cada gen o micro RNA (amplicón). El producto de PCR se somete a electroforesis y se purifica. Posteriormente se hacen diluciones 1:10 de la concentración de la solución de partida. Utilizando estas diluciones de concentración conocida se realiza un programa de

estandarización incluido en el *software* del termociclador. A partir de la curva estándar se pueden calcular la concentración y el número de copias de cada producto de PCR.

Los resultados de la qPCR se han expresado como número de copias por 25 ng de cDNA. Se han realizado dos tipos de análisis estadísticos: para comparar distintos grupos con el grupo control se ha utilizado el test de Student con la corrección de Welch (asume varianzas diferentes), y para comparar subgrupos dentro de cada grupo experimental se ha utilizado el test de ANOVA con el post-análisis de Bonferroni.

III. 6. MICROARRAY DE MICRO RNAs

Con el fin de determinar posibles micro RNAs en cuya regulación esté implicada la morfina, y por tanto, el sistema opioide, hemos mandado realizar un microarray a la Universidad de Minnesota en Minneapolis, en el laboratorio del Prof. Ping-Yee Law, del Departamento de Farmacología. Se analizaron los cambios de expresión producidos por la morfina en 385 micro RNAs, utilizando embriones de 16, 24 y 48 hpf, estadios clave en el desarrollo embrionario, ya que las 16 hpf marcan el comienzo de la diferenciación del Sistema Nervioso Central, las 24 hpf suponen el comienzo de la organogénesis y la diferenciación de la mayor parte de tipos neuronales y el estadio de 48 hpf es considerado el fin de la organogénesis.

De los 385 micro RNAs empleados en el microarray, sólo la expresión de 155 fue alterada por la exposición a morfina en los tres estadios. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en la Universidad de Minnesota, mediante programas específicos. A partir de los datos interpretados (tabla expuesta a continuación), escogimos el miR-133b, que regula la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas, que forman parte

tanto del circuito de recompensa, que controla la adicción, como de la modulación del dolor.

	16h	24h	48h	16h (M)	24h (M)	48h (M)
dre-mir-133b	1.155	0.845	2.006	1.966	0.01*	0.01*

Tabla en la que se representan los resultados de la expresión del miRNA-133b en embriones control de 16h, 24h y 48h y en embriones expuestos a morfina a esas mismas edades: 16h (M), 24h (M), 48h (M). M: morfina 10 nM.

III. 7. HIBRIDACIÓN *IN SITU* EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA

Los embriones se crían en una incubadora a 28.5° C, la temperatura correcta de desarrollo para evitar malformaciones, hasta que alcancen el estadio que se desea estudiar. Se anestesian colocando el recipiente en el que se encuentren sobre hielo seco y de esta manera se evita la dilución en el agua de anestésicos, que pueden alterar la expresión y actividad de los receptores opioides. Posteriormente se decorionan (se extrae el embrión del corion, la membrana externa que le rodea y le sirve de protección) con pinzas libres de RNasas y se fijan 5 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído diluido al 4% en tampón PBS. Los embriones decorionados y fijados se suspenden en etanol al 100% y se conservan a -20° C como máximo un mes.

El protocolo de hibridación comienza con la rehidratación progresiva de los embriones, suspendiéndolos en soluciones formadas por etanol 100% y PBTw (PBS al que se añade un 0.1% del detergente Tween-20) de manera que la concentración de PBTw va aumentando y disminuye la de etanol. De esta manera se evitan cambios bruscos de la presión osmótica que pueden dañar el embrión y a su vez el detergente provoca una cierta alteración de las membranas celulares aumentando la penetrabilidad de la sonda de hibridación. Cuando se trabaja con embriones mayores de 24 horas se

tratan a partir de las 10 horas post-fecundación con PTU (1-fenil-2-tiourea, 0.0003g/L) para evitar la pigmentación y poder observar el marcaje sin artefactos.

Para facilitar la penetración del oligonucleótido o ribosonda conjugado con la digoxigenina es necesario tratar los embriones del estadio de 24 hpf en adelante con proteinasa K después de la rehidratación y se lavan dos veces con PBTw.

En todos los casos se refijan los embriones con paraformaldehído 4%-PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lava 5 veces con PBTw, dejando el reactivo actuar en las dos últimas durante 5 minutos. Para la prehibridación se retira el PBTw y se reemplaza por la solución de hibridación sin el oligonucleótido, constituida por 50% de formamida, 5xSSC, 0.1% Tween 20, 5 mg/ml de RNA de levadura y 50 µg/ml de heparina. La solución se ajusta a pH 6,0 añadiendo 92 µl de ácido cítrico 1 M por cada 10 ml de solución de hibridación. Se invierte el tubo un par de veces, se deja que los embriones queden en el fondo y se repite la operación. La pre-hibridación tiene lugar en un termobloque durante 2 horas como mínimo a 65° C (60° C si son embriones más jóvenes de 10 horas post- fertilización, pues no resisten temperaturas más altas y pierden su estructura externa). En este tiempo se diluye el oligonucleótido o ribosonda en la solución de hibridación (la cantidad de solución de hibridación depende del número de embriones) a una concentración de 10 nM. El oligonucleótido o ribosonda están marcado con digoxigenina, la molécula que va a ser reconocida por el anticuerpo primario. Se debe calentar durante 3-5 minutos a la temperatura de hibridación para no provocar alteraciones en los embriones debidas a cambios bruscos de temperatura. Se reemplaza la solución de hibridación sin sonda por la solución de hibridación con sonda y se incuba a la temperatura de pre-hibridación durante toda la noche .

Los lavados post-hibridación se realizan con SSC (tampón de citrato sódico,

adquirido en SIGMA-Aldrich): 5 minutos con una mezcla SSC 2x / solución de hibridación sin sonda en una proporción 75%/ 25%, 10 minutos con SSC 2x y 3 lavados de media hora con SSC 0,2x. El SSC aumenta la concentración de sales del medio creando una situación suficientemente inestable como para degradar la sonda que no se haya hibridado y prevenir la aparición de fondo en el revelado.

Posteriormente se lavan los embriones dos veces con 300 µl tampón de ácido málico (MAB, NaCl 150 mM y ácido málico 100 mM a pH 8), en el que se va a disolver tanto el agente bloqueante (Roche) como el anticuerpo anti-digoxigenina, que está acoplado al enzima fosfatasa alcalina (Roche). De esta manera se logra que los embriones se equilibren con mayor facilidad. Se incuban durante tres horas a temperatura ambiente con 500 µl de MAB a los que se añade un 2% de agente bloqueante, solución llamada MAB1. Al finalizar esta incubación se retira esta solución y se añade el anticuerpo anti-digoxigenina disuelto en MAB1, en una proporción 1:6000, incubando los embriones durante toda la noche a 4° C. Después se realizan 6 lavados de 15 minutos cada uno MAB. Se retira el MAB y se añade Tris HCl 0,1 M a pH 9,5 que lleva un 0.1% de Tween-20. Entonces se transfieren los embriones a una placa de pocillos, se retira esta solución y se reemplaza por BM Purple Substrate (Roche), un sustrato de la fosfatasa alcalina acoplada al anticuerpo anti-digoxigenina, cuya defosforilación da lugar a un precipitado azul-morado en las regiones en las que ha tenido lugar la hibridación. Se deja incubar a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que se empiece a ver el precipitado (proceso que puede durar desde media hora hasta toda la noche).

Para la detección de los ligandos de Notch, DeltaA, DeltaD, y del gen diana Her 15, hemos empleado Fast Red (Roche) como sustrato de la fosfatasa alcalina, ya que el precipitado que se produce al ser defosforilado puede ser detectado con luz fluorescente,

además de con luz natural, a una longitud de onda de 546 nm. De esta manera las muestras pueden ser analizadas con un microscopio de epifluorescencia, o un microscopio confocal, como en este caso.

Para la detección de los receptores ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfORL se han empleado oligonucleótidos acoplados a digoxigenina. Wnt1, los ligandos de Notch y Her 15 se han detectado mediante ribosondas. La sonda de Wnt1 ha sido cedida por el Dr. Stephen Wilson (University College of London, Inglaterra) y las sondas referentes a Notch, por el Dr. Patrick Blader (CNRS-Biologie du Development, Toulouse, Francia).

III. 8. DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA

Para realizar las técnicas inmunohistoquímicas sobre embriones, éstos deben ser decorionados a la edad a la cual se vayan a sacrificar. Una vez decorionados, los embriones se fijan con una solución de 4% de paraformaldehído en PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaHPO, 2 mM KHHPO en agua destilada) a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se lavan tres veces en PBS 1X y se guardan en metanol a -20 °C al menos 24 horas. Pasado este tiempo, los embriones se rehidratan, lavándolos con soluciones que aumentan progresivamente la concentración de PBS, disminuyendo la de metanol: 1) 75% metanol-25% PBS; 2) 50% metanol-50% PBS; 3) 25% metanol-75% PBS. 4) PBS 1X-0.1% Tween 20 (detergente). Posteriormente se preparan los embriones rehidratados para cortar en criostato. Para ello, se introducen en una mezcla de agar 1.5% y 10% de sacarosa en PBS 1X. Los embriones se deben orientar con ayuda de una lupa antes de que la solución se gelatinice. El agar es entonces cortado, de manera que cada embrión queda en una porción independiente, y estas porciones se

introducen en una mezcla crioprotectora formada por 30% de sacarosa en PBS 1X, dejándolas a temperatura ambiente toda la noche. Las microsecciones (12 μ m) se llevan a cabo con un criostato LEICA Microm HM 560. Las secciones se dejan secar, se rehidratan en una solución de PBS-0.1% Tween 20 y se añade una solución de bloqueo que inhibe uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Esta solución de bloqueo está compuesta por un 5% de suero del animal de cual se haya extraído el anticuerpo secundario a utilizar (generalmente, cabra) en PBS 1X. Se incuban las secciones en la solución bloqueante durante 2 horas a temperatura ambiente y se añade el anticuerpo primario. Posteriormente se incuban las secciones con el anticuerpo primario durante 24 horas a 4°C y se realizan 3 lavados en PBS. Se añade entonces el anticuerpo secundario, utilizando como solución la de bloqueo, dejándola incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios empleados están acoplados a una molécula fluorescente (Alexa), que emita a distinta longitud de onda y permita hacer doble marcaje. La fluorescencia permite mayor resolución y por ello es el método de detección empleado en los estudios de inmunohistoquímica de esta Tesis Doctoral.

Hemos empleado los siguientes anticuerpos primarios:

Anticuerpo	Concentración	Casa comercial
Anti-Pax6 hecho en conejo	1:500	Covance
Anti-Pax2 hecho en conejo	1:500	Abcam
Anti-calretinina hecho en ratón	1:250	Swant
Anti-TH hecho en conejo	1:500	Millipore
Anti-H3P hecho en ratón	1:500	Abcam

Para detectar los anticuerpos primarios hemos utilizado dos anticuerpos secundarios: anti-ratón acoplado a Alexa 488 (verde) y anti-conejo acoplado a Alexa 546 (rojo). Además hemos utilizado DAPI como marcador de núcleos celulares.

La visualización de los resultados obtenidos mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha realizado con un microscopio de epifluorescencia Olympus AX70 (TH, Pax-2, Pax-6, H3P, calretinina) y con un microscopio confocal (Leica SP5). El conteo de células se ha llevado a cabo con el programa Image J.

III. 9. CLONACION DE LA REGION 3'UTR DE PITX3

Como paso previo a la inyección en embriones de pez cebra de la región 3'UTR del factor de transcripción Pitx3, es necesario clonarla, utilizando para ello oligonucleótidos que anillen en la secuencia de Pitx3 de pez cebra publicada en la base de datos Ensembl (Fig. 16). La finalidad de la inyección de la región 3'UTR de Pitx3 es evitar que el miRNA-133b se una a la región 3'UTR del Pitx3 endógeno e inhiba su traducción. De esta manera se anula la actividad del miR-133b y a la vez, se verifica que la región 3'UTR de Pitx3 es diana de este miRNA.

En primer lugar se amplifica mediante PCR básica la región 3'UTR de Pitx3 utilizando 200 ng de cDNA y el Kit PCR Master Mix de Promega (12,5 µl de Master Mix, 8,5 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl de oligonucleótidos 10 pmol/µl y 2 µl de cDNA 100 ng/µl). Posteriormente, el producto de PCR es sometido a electroforesis y purificado, para de esta manera proceder a su ligación en un vector de clonación (TOPO-TA pCR 2.1: 1 µl ligasa, 3 µl plásmido, 6 µl de producto purificado, en un

volumen final de 10 µl). La ligación se incubó toda la noche a 16 °C. Para la obtención de grandes cantidades de plásmido con la región 3'UTR, se transformará 5 µl de esta construcción en 30 µl de células supercompetentes TOP10F', según el siguiente protocolo: 30 minutos en hielo, 1 minuto a 42 °C, 5 minutos en hielo, 1 hora en agitación a 37 °C y por último se siembran en una placa con ampicilina, X-Gal e IPTG (para diferenciar las que tienen la construcción completa, que se verán de color blanco, de las que tienen sólo el plásmido, que se verán de color azul) y se dejan crecer toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se seleccionan las colonias blancas, se siembran en medio líquido con ampicilina, se dejan crecer toda la noche a 37 °C en agitación y se procede a la extracción del plásmido con el kit de midipreps en columnas de SIGMA. Así nos aseguraremos de obtener como mínimo concentraciones de 2 µg/µl de plásmido con la construcción requerida, lo que facilita la eficiencia en la inyección.

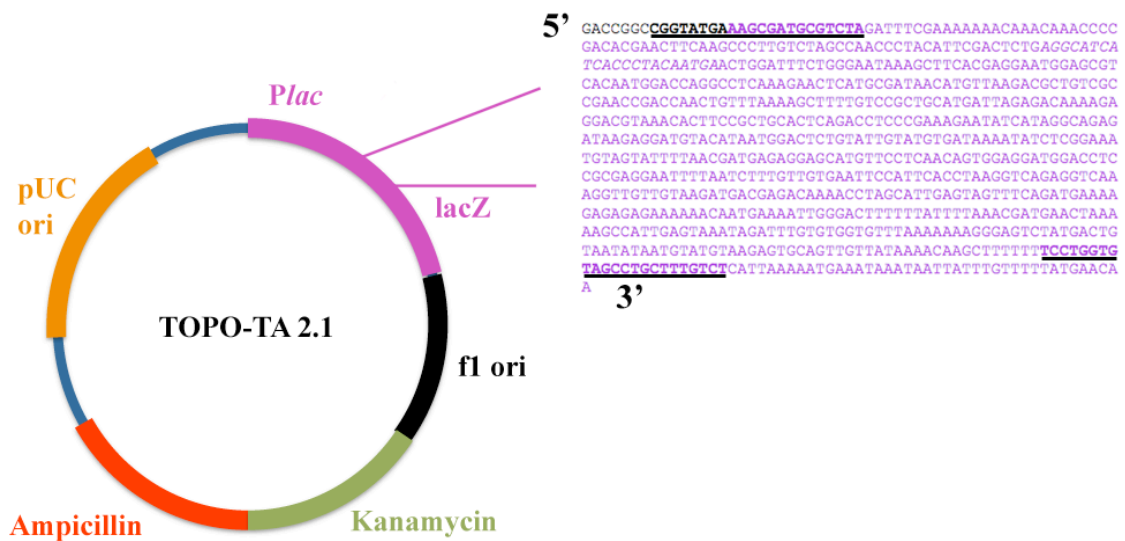


Figura 16. Esquema que representa la inserción de la región 3'UTR de Pitx3, considerada diana para el microRNA 133b, en el vector de clonación TOPO-TA 2.1. El inserto se clonó en la región de clonación múltiple (del inglés, multiple cloning site) sin necesidad de utilizar enzimas de restricción, dado que el plásmido TOPO-TA 2.1 es abierto, de manera que en los extremos presenta una T que se une a la A terminal que añade la Taq polimerasa al producto de PCR. Los oligonucleótidos empleados para amplificar la región 3'UTR (secuencia en color morado) aparecen subrayados en negro y en letra negrita. El oligo *forward* fue diseñado entre el final del marco de lectura abierto (secuencia en color negro) y el principio de la región 3'UTR.

III. 10. MICROINYECCION DE MORFOLINOS Y DNA

Los morfolinós son oligonucleótidos modificados químicamente que mantienen la capacidad de unirse a una región del mRNA por complementariedad de bases. Mediante esta unión a su región diana del transcrito impide el avance de la maquinaria de traducción, y de esta manera silencia la expresión (*knockdown*) y, por tanto función, de la proteína (Nasevicius y Ekker, 2000). La inyección de morfolinós (adquiridos de Gene Tools), se ha realizado según la metodología desarrollada por Nasevicius y Ekker (2000). Para ello hemos empleado un sistema de microinyección y micromanipulación diseñado especialmente para la inyección de embriones de pez cebra (Eppendorf; Figs. 17 y 18), acoplado a un estereoscopio (Zeiss Discovery V8) y una cámara de alta resolución que permita la realización de vídeos y fotos con fines formativos y de difusión (Fig. 17).

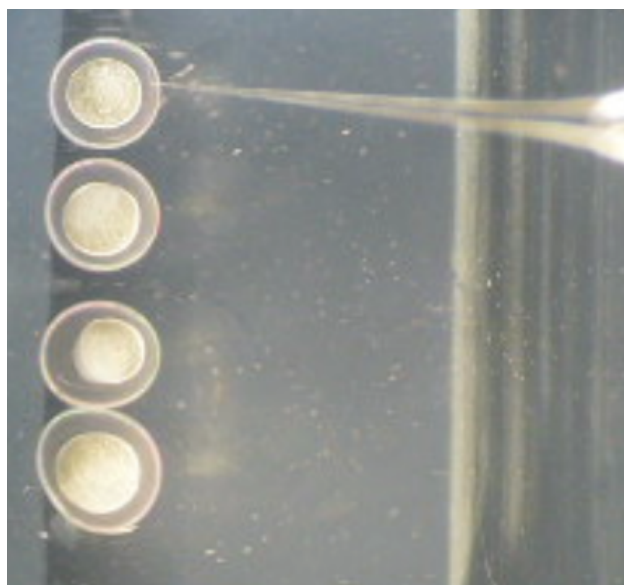


Figura 17. Microinyección de embriones de pez cebra en el estadio de una célula.



Figura 18. Sistema de microinyección y micromanipulación (Eppendorf) para embriones, acoplado un estereoscopio (Zeiss Discovery V8).

En primer lugar se debe determinar la concentración a la cual se van a inyectar los morfolinis. Para ello se pulsa el microinyector 10 veces, a un tiempo de 10 ms por pulso, en un microcapilar 1-1, es decir, con una capacidad total de 1 ml y una longitud de 33 mm, por lo que 1 mm representa 30 nl de solución. Se mide la cantidad de solución que se ha introducido con los 10 pulsos en el capilar y se calibran los parámetros de presión y tiempo de pulso adecuados al volumen inyectado, calculando que en cada pulso se inyectan 3 nl de solución en el embrión. Una vez determinada la concentración que se está empleando, se analiza la supervivencia embrionaria y posibles malformaciones que den lugar a resultados falseados. Para evitar esta situación, se inyectan diferentes concentraciones, hasta encontrar aquella que, produciendo el menos daño posible, provoque el mayor efecto en aquello que se quiere estudiar. Los

embriones se inyectan entre los estadios de 1 a 4 células, preferentemente en el vitelo, para así evitar la disrupción celular y disminuir el porcentaje de muerte embrionaria. Los embriones inyectados se mantienen en las mismas condiciones que los no inyectados, es decir a 28,5 °C y en medio E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄ en agua destilada). En la siguiente tabla se muestran las diferentes sustancias que han sido inyectadas durante la realización de este proyecto de investigación, así como la concentración empleada y la edad y región anatómica en la que han sido inyectados los embriones.

	Concentración	Edad y lugar de inyección
Morfolino para ZfMOR AATGTTGCCAGTGTTTTCCATCATG	0,2 µM	4 células; vitelo
Morfolino para ZfDOR1 AATGTTGCCAGTGTTTTCCATCATG	1 µM	4 células; vitelo
Morfolino para ZfDOR2 AAGCTGGCCATTGACGGAAATGC	1 µM	4 células; vitelo
3'UTR de Pitx3	0,1 ng/µl	1 célula; célula

IV. RESULTADOS

IV.1. INTRODUCCION

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado durante las dos últimas décadas una línea de investigación basada en el estudio de los sistemas implicados en la producción y modulación del dolor, por una parte y en los mecanismos relacionados con los fenómenos de tolerancia y dependencia a ciertos fármacos, la mayoría de los cuales utilizados como analgésicos. Para ello, en los últimos años, nos hemos centrado en el sistema opioide endógeno, y fundamentalmente, en los receptores opioides, cuya activación desencadena los procesos bioquímicos responsables del control de la sensación dolorosa y del desarrollo de tolerancia, dependencia, y en algunos casos, adicción.

Utilizando el pez cebra como organismo modelo, hemos caracterizado distintos componentes de este sistema: receptores, ligandos endógenos, mecanismos de activación, etc. (Alvarez et al., 2006; Barrallo et al., 1998a; Barrallo et al., 1998b; de Velasco et al., 2009; Gonzalez Nunez et al., 2003; Gonzalez-Nunez et al., 2003a; Gonzalez-Nunez et al., 2003b; Gonzalez-Nunez et al., 2007a; Gonzalez-Nunez et al., 2007b; Pinal-Seoane et al., 2006; Rivas-Boyero et al., 2011). Basándonos en nuestra propia experiencia y en los resultados publicados por la comunidad científica internacional, que presenta al pez cebra como valioso modelo experimental en el campo de la Biomedicina (Dooley and Zon, 2000; Goldsmith, 2004; Guo, 2004), nos planteamos que este organismo puede aportar datos esenciales para desentrañar los mecanismos intracelulares y bioquímicos que nuestro Sistema Nervioso, a lo largo de muchos años de evolución, emplea ante fenómenos tan adversos para la humanidad tanto como el dolor o la adicción. Durante la realización de este trabajo de investigación hemos obtenido importantes resultados que proporcionan un mayor y más profundo conocimiento sobre la actividad funcional del sistema opioide endógeno, concretamente

a través de los receptores opioides y su actividad durante el desarrollo embrionario del pez cebra. La sección de Resultados se subdivide en los siguientes apartados:

1. Expresión de los receptores opioides durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
2. Estudio de la expresión de ORL durante el desarrollo embrionario del pez cebra: influencia de la morfina y la nociceptina.
3. Influencia de la morfina en la expresión de los receptores opioides y en los cambios celulares y neuronales durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
4. Influencia de la morfina sobre la cascada de regulación del miR-133b mediante la activación del receptor opioide μ .
5. Análisis de la actividad neuroprotectora de la morfina a través de la activación de los receptores opioides tipo delta y su relación con el miR-133b y sus genes diana.
6. Estudio de sistemas de señalización intracelular cuya transcripción puede ser regulada por el sistema opioide.

IV. 2. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES OPIOIDES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA

Durante la primera etapa de este proyecto de Tesis Doctoral hemos analizado la expresión de los receptores opioides “clásicos”, mu, delta 1, delta 2 y kappa durante el desarrollo embrionario del pez cebra con el objeto de determinar las etapas en las que su expresión es máxima y de esta manera poder establecer posibles procesos de la embriogénesis en los que estos receptores estuvieran implicados. El análisis de la expresión génica ha sido llevado a cabo utilizando las técnicas de qRT-PCR y de hibridación *in situ*, como se menciona en la sección de Material y Métodos. La distribución del receptor opioide kappa no ha sido determinada, dado el bajo nivel de expresión génica detectado mediante qRT-PCR, que imposibilita su detección mediante métodos menos sensibles como la hibridación *in situ*.

La expresión de los receptores opioides mu, delta 1, delta 2 y kappa durante el desarrollo embrionario del pez cebra, cuya cuantificación ha sido determinada mediante qRT-PCR, presenta perfiles bien diferenciados (Fig. 19), siendo el receptor opioide mu el que muestra un mayor nivel medio de expresión génica a lo largo del proceso, aunque se observan cuatro picos de expresión: 3 hpf, 22 hpf, 48 hpf 72 hpf. La expresión del receptor mu en el pez cebra adulto es inferior a la media obtenida durante el desarrollo embrionario. Por otra parte, los receptores opioides delta duplicados, ZfDOR1 (b) y ZfDOR2 (c), exhiben un perfil de expresión génica caracterizado por la presencia de tres picos y un pico de expresión respectivamente. Ambos receptores presentan un incremento en el número de copias a las 22 hpf, y al igual que el receptor opioide mu, el nivel de expresión génica disminuye a las 24 hpf.

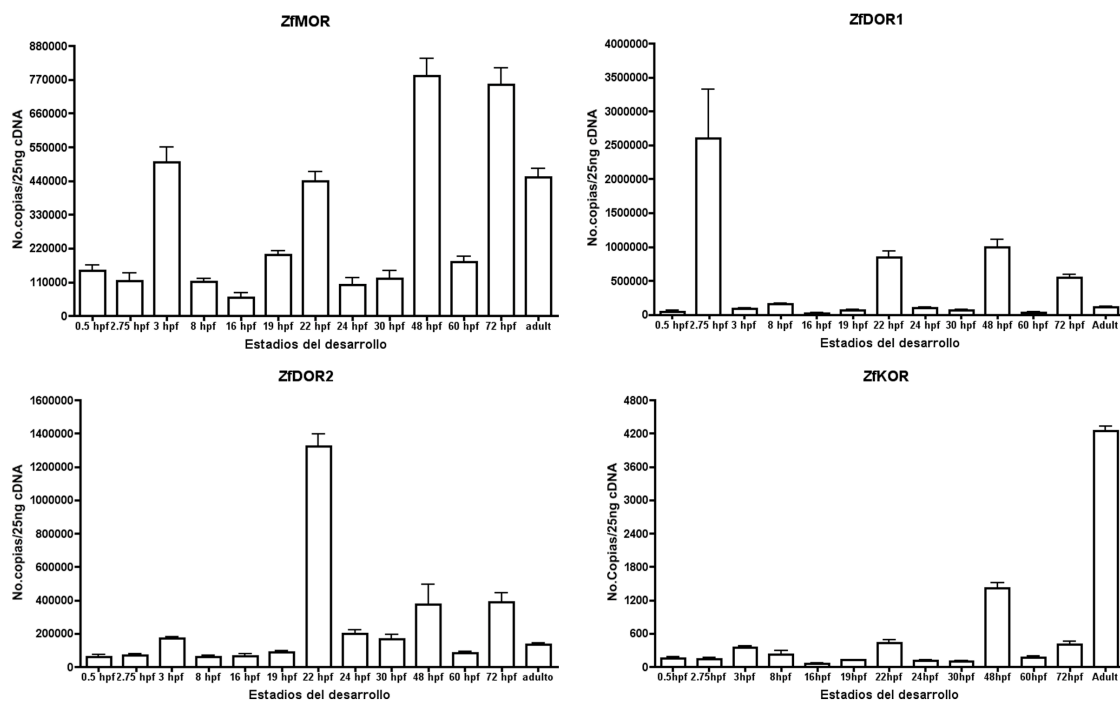


Figura 19. Expresión temporal de los receptores opioides durante el desarrollo embrionario del pez cebra desde las 0.5 hpf (estadio de una célula) hasta el final del desarrollo embrionario (72 hpf). Hemos incluido también los datos referentes a la expresión de cada receptor en el animal adulto. A) Expresión del receptor opioide mu. B) Expresión del receptor opioide delta 1. C) Expresión del receptor opioide delta 2. D) Expresión del receptor opioide kappa.

Receptor Opiode mu (ZfMOR)

Mediante la técnica de hibridación *in situ* se han podido determinar las regiones anatómicas del embrión en las cuales están presentes los receptores opioides. El receptor opioide mu se encuentra distribuido a lo largo del tubo neuronal (Fig. 20), destacando el telencéfalo, la epífisis, el diencéfalo, el pretectum, el cerebelo y el rombencéfalo como áreas en las que este receptor se expresa en mayor medida a las 24 hpf (B, C). En embriones de 48 hpf, el receptor opioide mu se detecta en el *tegmentum*, que es la región del Sistema Nervioso Central que al diferenciarse en estadios posteriores dará lugar al área tegmental ventral (E), origen del sistema dopaminérgico, que está implicado tanto en los procesos relacionados con el dolor como con la adicción. Además, este receptor está presente en hipófisis, vesícula ótica y vejiga natatoria, también a las 48 hpf (F).

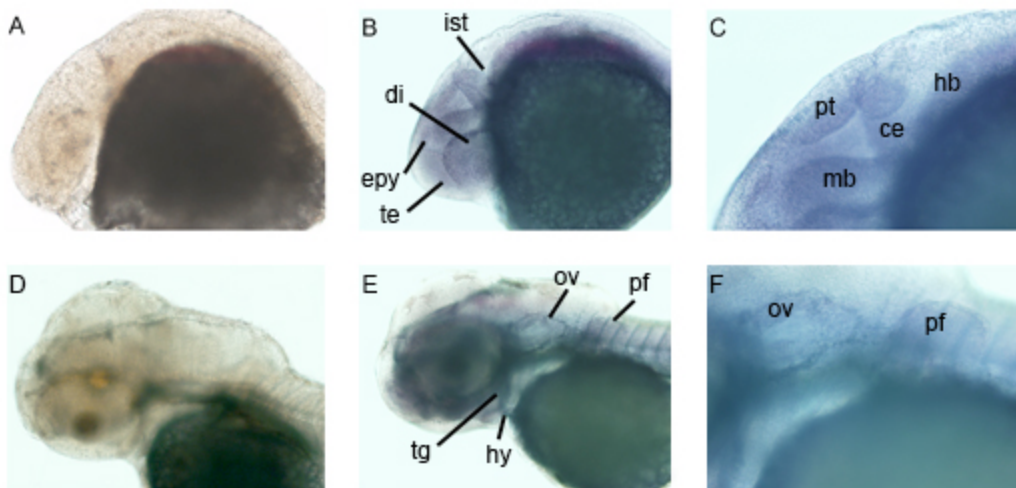


Figura 20. Distribución del receptor opioide mu en embriones de 24 hpf (A, B, C) y de 48 hpf (D, E, F). Te: telencéfalo; epy: epífisis; di: diencéfalo; ist: istmo del cerebelo; pt: pretegmentum; ce: cerebelo; hb: rombencéfalo; tg: tegmentum; hy: hipófisis; ov: vesícula ótica; pf: vejiga natatoria.

Receptores Opioides delta 1 y 2 (ZfDOR1 y ZfDOR2)

La distribución de los receptores opioides tipo delta de pez cebra, ZfDOR1 y ZfDOR2 (Fig. 21), se localiza fundamentalmente en el cerebro medio (*pretegmentum* y cerebelo) y rombencéfalo de embriones de 24 hpf (B), aunque ZfDOR1 está presente también en telencéfalo y epífisis (B). A las 48 hpf, el receptor ZfDOR1 presenta una distribución en las regiones más ventrales del cerebro (hipófisis, tegmento ventral), y sin embargo, su duplicado, ZfDOR2 es detectado en áreas más dorsales, del telencéfalo, diencéfalo y cerebro medio (mesencéfalo), así como en la vejiga natatoria.

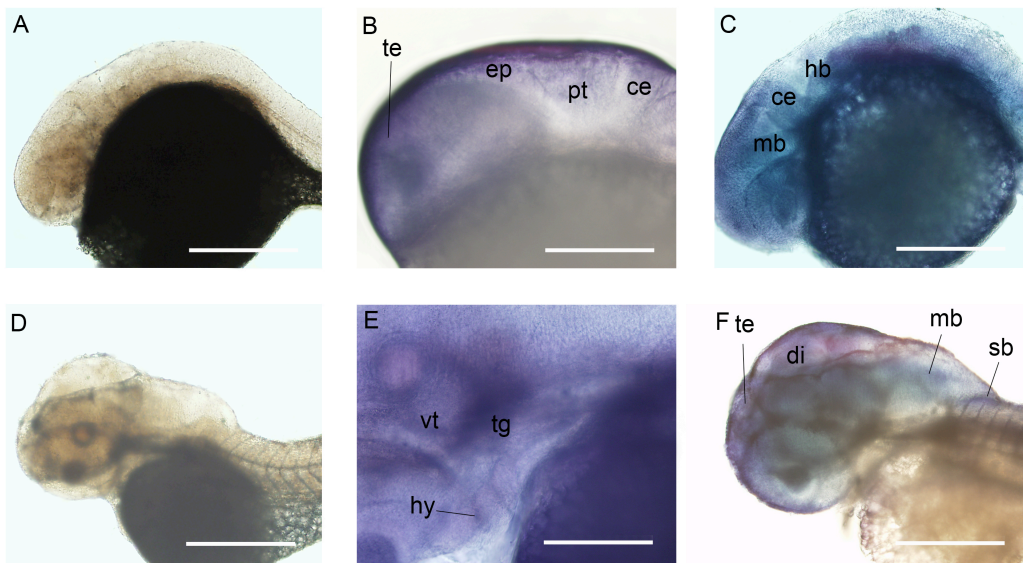


Figura 21. Distribución de los receptores opioides tipo delta en embriones de 24 y 48 hpf. A, D) controles negativos. B) Expresión de ZfDOR1 en embriones de 24 hpf. C) Expresión de ZfDOR2 en embriones de 24 hpf. E) Expresión de ZfDOR1 en embriones de 48 hpf. F) Expresión de ZfDOR2 en embriones de 48 hpf. Te: telencéfalo; ep: epifisis; di: diencéfalo; pt: pretectum; ce: cerebelo; mb: mesencéfalo; hb: rombencéfalo; tg: tegmentum; hy: hipófisis; vt: tálamo ventral; sb: vejiga natatoria.

IV. 3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ORL DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA: INFLUENCIA DE LA MORFINA Y LA NOCICEPTINA

El receptor ORL, considerado tras su descubrimiento en 1995 parte de la familia de los receptores opioides, comparte una elevada homología a nivel molecular con los denominados receptores opioides clásicos mu, delta y kappa (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995). Sin embargo, su actividad en el SNC presenta claras diferencias con estos receptores, de manera que aunque a nivel espinal su activación origina analgesia, a nivel supraespinal actúa como agente anti-opioide, produciendo hiperalgesia (Chiou et al., 2007; Mogil and Pasternak, 2001). Esta particularidad sitúa al receptor ORL en el punto de mira de la investigación de los opioides, y a pesar de los esfuerzos de la comunidad científica por desentrañar el engranaje molecular que determina su actividad, aún se desconocen piezas fundamentales para la comprensión de dicho engranaje. Además, algunos estudios publicados en los últimos años, sugieren que el receptor ORL puede dimerizar con el receptor opioide mu incrementando la capacidad de la morfina de producir tolerancia en este receptor. Por ello estamos convencidos de la necesidad de ampliar los conocimientos sobre el receptor ORL, sobre todo analizando el patrón de expresión génica durante el desarrollo embrionario, un campo aún por explorar. También hemos determinado la influencia tanto de la morfina como de la nociceptina, agonista endógeno del receptor ORL, sobre su expresión a las 24 y 48 hpf. De esta manera se podrán sugerir nuevas funciones del receptor ORL y profundizar en el conocimiento de su actividad.

Al igual que los receptores opioides clásicos, mu, delta y kappa, el receptor ORL presenta un perfil de expresión génica variable a lo largo del desarrollo embrionario, caracterizado por dos picos de expresión a las 48 y 72 hpf (Fig. 22). Se detecta

asimismo un elevado nivel de expresión a las 3 hpf con respecto a los estadios iniciales, coincidiendo con la transición midblástula. Aunque durante el periodo de Segmentación (16-24 hpf) no se observa un aumento en la expresión génica del mismo nivel que los ya mencionados, se puede observar en la figura 22 un incremento progresivo en el número de copias desde las 16 hasta las 22 hpf, disminuyendo posteriormente a las 24 hpf. La expresión de ORL en el animal adulto es menor que durante el desarrollo embrionario.

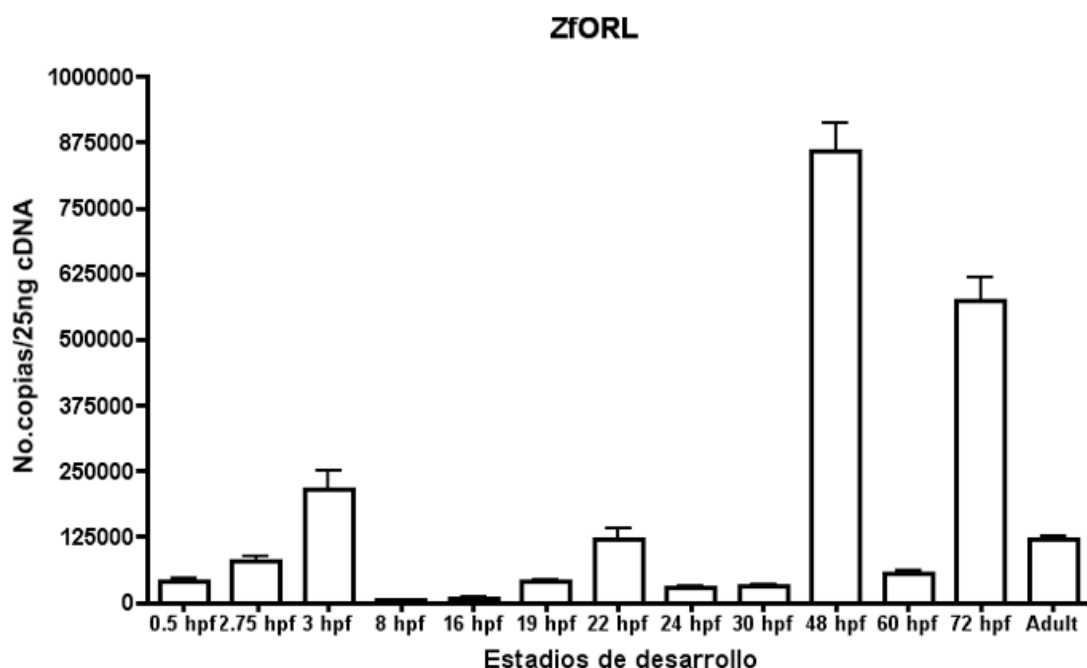


Figura 22. Expresión del receptor ORL/NOP durante el desarrollo embrionario del pez cebra y en adulto. En el gráfico se pueden observar varios picos de expresión de ZfORL: en la transición midblástula (3 hpf), al final del periodo de Segmentación (22 hpf), a las 48 hpf y en la eclosión (72 hpf).

Como ya se ha mencionado, el ligando endógeno del receptor ORL es la nociceptina, producto de proteólisis de la pronociceptina, su proteína precursora. La nociceptina es un potente anti-analgésico y se encuentra distribuida por todo el Sistema Nervioso Central en mamíferos (Xu et al., 1996). Su actividad no es antagonizada por la naloxona, por lo que aunque comparte homología a nivel molecular con péptidos opioides endógenos, como la dinorfina (ligando endógeno del receptor opioide kappa),

y por tanto se considera parte de la familia de los opioides, no está clasificada como opioide clásico (Reinscheid et al., 1996; Reinscheid et al., 1998; Wang et al., 1996). Además, controla un gran número de funciones fisiológicas, como el apetito, la actividad locomotora espontánea, la memoria, la motilidad gastrointestinal o la función cardiovascular. Habiendo analizado la expresión de su receptor durante el desarrollo, nos planteamos estudiar la influencia que ejerce la exposición a nociceptina (10 nM) sobre la expresión génica de ORL (Fig. 23). Como se puede observar en el figura 23A, a las 24 hpf la nociceptina no afecta al nivel de expresión de su receptor, y sin embargo, la exposición al antagonista de ORL, nocistatina, incrementa este nivel, aumentando aún más la expresión cuando los embriones son expuestos simultáneamente a la nociceptina y a la nocistatina. A las 48 hpf (figura 23B), la sobreexposición a nociceptina inhibe casi completamente la expresión de ORL, un efecto parcialmente revertido por la exposición simultánea de nociceptina y nocistatina. El antagonista nocistatina no modifica significativamente la expresión de ORL.

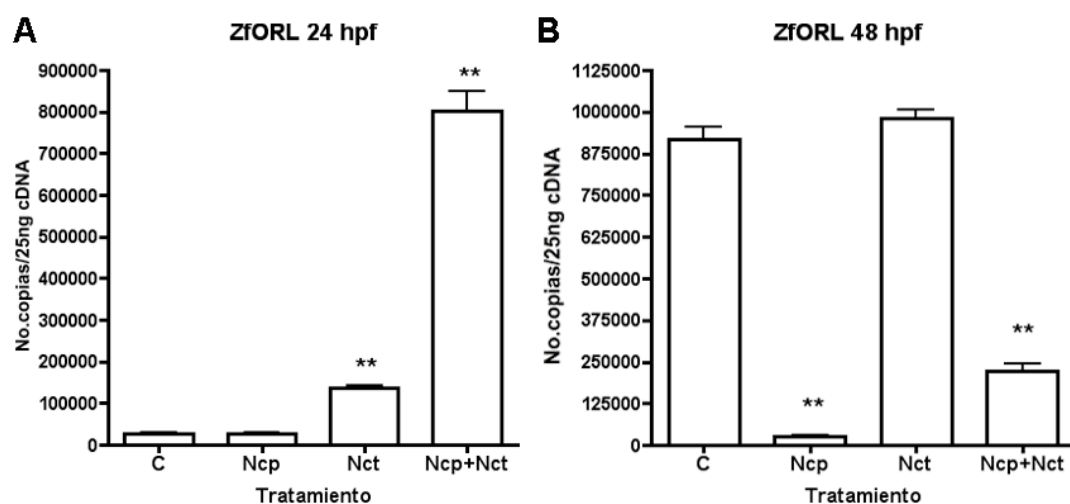


Figura 23. Influencia de la nociceptina (Ncp) en la expresión del receptor ORL/NOP a las 24 (A) y 48 (B) hpf. La exposición a nociceptina no altera la expresión de su receptor a las 24 hpf, pero la reduce drásticamente a las 48 hpf. La nocistatina (Nct), sin embargo, aumenta la expresión de ZfORL a las 24 hpf y no tiene ningún efecto sobre su expresión a las 48 hpf. La exposición

simultánea a nociceptina y nocistatina induce un aumento de la expresión de ORL a las 24 hpf y la reduce a las 48 hpf. ** $P \leq 0.005$, Test de Student con corrección de Welch.

El receptor ORL presenta escasa o nula afinidad por la morfina (Mollereau et al., 1994), prototipo de agonista opioide, que se une con mayor afinidad con el receptor opioide μ , como ya ha sido comentado. Sin embargo, considerando la capacidad de ORL de dimerizar con el receptor opioide μ produciendo un incremento de tolerancia de este receptor por la morfina (Wang et al., 2005), es interesante analizar los posibles efectos que tiene la morfina asobre la expresión de ORL y de esta manera sugerir a la comunidad científica posibles mecanismos a través de los cuales la morfina, y por extensión otros agonistas opioides, inducen tolerancia que puede derivar en adicción. En embriones tanto de 24 hpf (Fig. 24A) como de 48 hpf (Fig. 24B), la morfina disminuye el nivel de expresión de ORL, y en ambos casos, este efecto es revertido por el antagonista naloxona, por lo que se considera que el efecto producido por la morfina deriva de la activación de un receptor opioide.

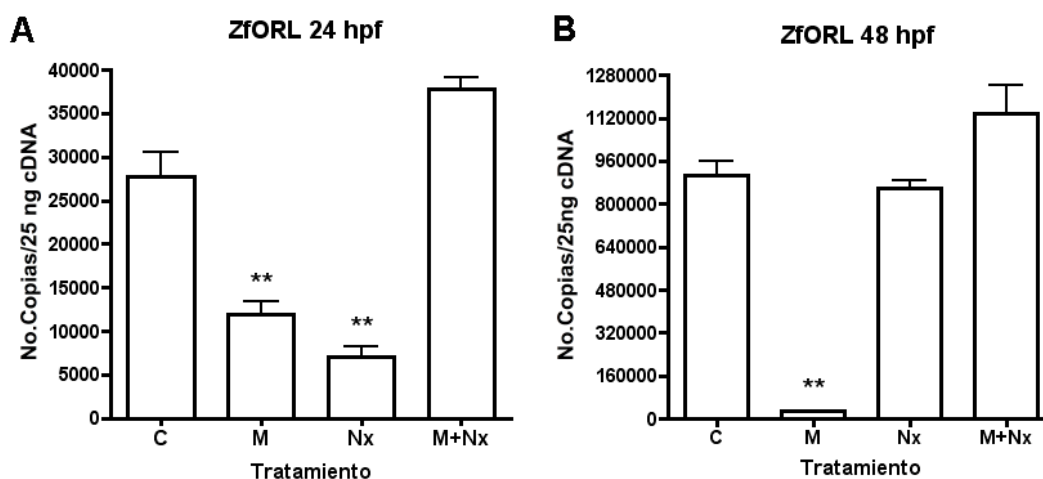


Figura 24. Influencia de la morfina (M) en la expresión del receptor ORL/NOP en embriones de 24 (A) y 48 (B) hpf. En ambos estadios del desarrollo la morfina reduce el número de copias de ZfORL, efecto inhibido por el antagonista naloxona (Nx) cuando los embriones se exponen simultáneamente a ambas sustancias. ** $P \leq 0.005$, Test de Student con corrección de Welch.

Además de cuantificar los cambios en el nivel de expresión génica de ORL producidos por su ligando endógeno (nociceptina) y la morfina, hemos estudiado los cambios que ambos agentes inducen en la distribución de este receptor, con el fin de relacionar los efectos que producen tanto la nociceptina como la morfina en el SNC con variaciones en la distribución de ORL y que de esta manera se produzcan cambios en su actividad, responsables de dichos efectos (Fig. 25). En embriones control (Fig. 25A), ORL está presente en las regiones ventrales del cerebro anterior (diencefalo), preteectum, mesencefalo y rombencefalo. La morfina (Fig. 25B) apenas afecta la distribución de ORL en el tubo neuronal. Sin embargo, la nociceptina, aunque produce una disminución en la detección de ORL en regiones caudales del cerebro, induce un aumento de expresión de este receptor en el telencefalo.

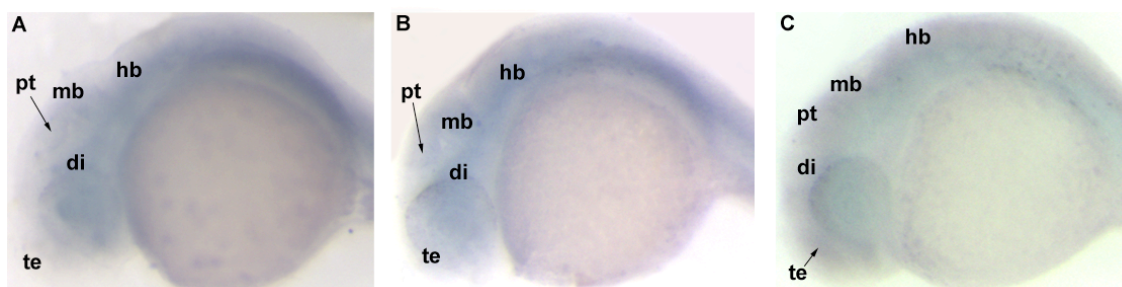


Figura 25. Distribución del receptor ORL/NOP en embriones de 24 hpf control (A), expuestos a nociceptina 10nM (B) y expuestos a morfina 10 nM (C). te: telencefalo; di: diencefalo; pt: preteectum; mb: mesencefalo; hb: rombencefalo.

A las 48 hpf tanto la morfina como la nociceptina disminuyen considerablemente el nivel de expresión génica de ORL (Fig. 26). Esta disminución se puede apreciar de la misma manera en las figuras 26B (morfina) y 26C (nociceptina), en las que ORL desaparece de la región diencefálica, así como de la separación entre el mesencefalo y el rombencefalo. Por el contrario, al igual que ocurre en embriones de 24 hpf expuestos a nociceptina, en embriones de 48 hpf expuestos tanto a morfina como a

nociceptina se detecta un incremento en la expresión de ORL en la región más rostral del telencéfalo.

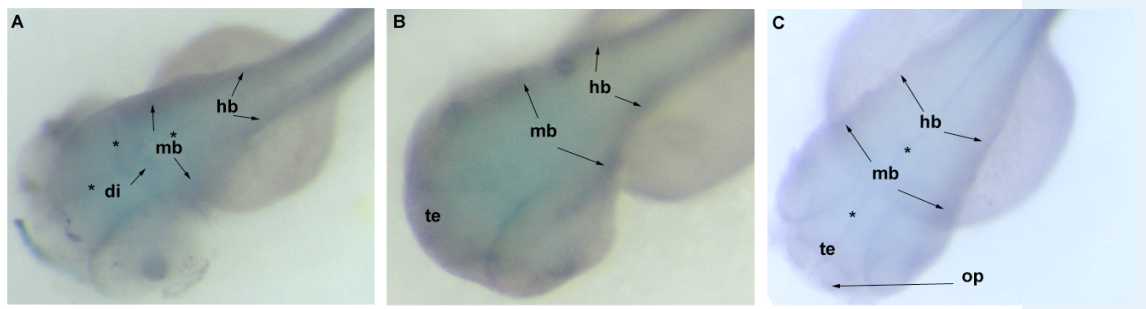


Figura 26. Distribución del receptor ORL/NOP en embriones de 48 hpf control (A), expuestos a nociceptina 10nM (B) y expuestos a morfina 10 nM (C). te: telencéfalo; di: diencéfalo; op: techo óptico; mb: mesencéfalo; hb: rombencéfalo.

IV. 4. INFLUENCIA DE LA MORFINA EN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES OPIOIDES Y EN LOS CAMBIOS CELULARES Y NEURONALES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA

Teniendo en consideración los resultados obtenidos en el primer apartado de esta sección, en los que se describen los distintos perfiles de expresión génica de los receptores opioides durante el desarrollo embrionario, hemos estudiado la implicación de la morfina en tres procesos relacionados con la maduración y diferenciación del SNC: la proliferación celular, la diferenciación neuronal y la protección neuronal. Se ha demostrado *in vitro* que los receptores opioides están implicados en estos procesos (Kim et al., 2006; Narita et al., 2006; Zhang et al., 2000), pero debido a la complejidad que presentan los organismos vivos, los resultados obtenidos *in vitro* no siempre coinciden con los procesos que tienen lugar *in vivo*. Además, recientemente se ha demostrado que la morfina incrementa la proliferación de ciertos tipos de células tumorales, lo que acrecienta el interés por el estudio de los efectos de la morfina en estos procesos. En este sentido los resultados que se describen en este apartado hacen referencia a la influencia que ejerce la morfina no sólo en proliferación celular, diferenciación neuronal y protección neuronal, sino también en la expresión de los receptores opioides. De esta manera nuestros resultados aportan nuevas perspectivas sobre las diversas funciones del sistema opioide endógeno y sobre los efectos de la morfina, mas allá de su actividad como sustancia analgésica.

Como se aprecia en la figura 27, la morfina induce *in vivo* un incremento en el número de células proliferativas (verde) en todo el tubo neural a las 24 hpf (Fig. 27C). A las 48 hpf, el aumento de la proliferación celular se detecta sobre todo en la región dorsal del mesencéfalo (Fig. 27D). La exposición de los embriones al antagonista

naloxona no modifica el número de células en proliferación en comparación con el grupo control en ninguno de los estadios estudiados, aunque la naloxona es capaz de revertir el incremento de la proliferación inducido por la morfina tanto a las 24 como a las 48 hpf. En esta misma figura mostramos la implicación de la morfina en la diferenciación neuronal, considerando los estudios *in vitro* que establecen que el receptor opioide mu, el que con mayor afinidad se une a la morfina, incrementa la tasa de diferenciación de los precursores neurales. Hemos empleado Pax-6 a las 24 hpf y Pax-2 a las 48 hpf como marcadores neuronales porque presentan una distribución muy localizada y específica, lo que facilita el análisis posterior. Pax-2 es un factor de transcripción relacionado con la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas (entre otras funciones) que como se ha explicado en la introducción, son importantes tanto en el control del dolor como de la adicción. A las 24 hpf, las neuronas positivas a Pax-6 son, junto con las motoneuronas, uno de los pocos tipos neuronales diferenciados, y dado que Pax-2 no se expresa en este estadio, elegimos un marcador de neuronas que tuviera una distribución y función semejantes a Pax-2, como es Pax-6. Nuestros resultados indican que la morfina aumenta el número de neuronas Pax-6 positivas a las 24 hpf (Fig. 27E), fundamentalmente en el mesencéfalo ventral, y sin embargo, disminuye la tasa de diferenciación neuronal a las 48 hpf (Fig. 27F), analizando el número de neuronas Pax-2 positivas, sobre todo en el cerebelo. Al igual que ocurre en los estudios de proliferación, la naloxona por sí misma no produce ningún efecto sobre las neuronas estudiadas, aunque revierte el efecto de la morfina en ambos estadios: a las 24 hpf, la exposición simultánea de morfina y naloxona inhibe el incremento en el número de neuronas producido por la morfina (Fig. 27G), y a las 48 hpf, la naloxona inhibe el descenso en la diferenciación neuronal inducido por este agonista opioide (Fig.

27H). En la figura 28 se cuantifican los resultados aquí descritos mediante el conteo tanto de células proliferativas como de neuronas.

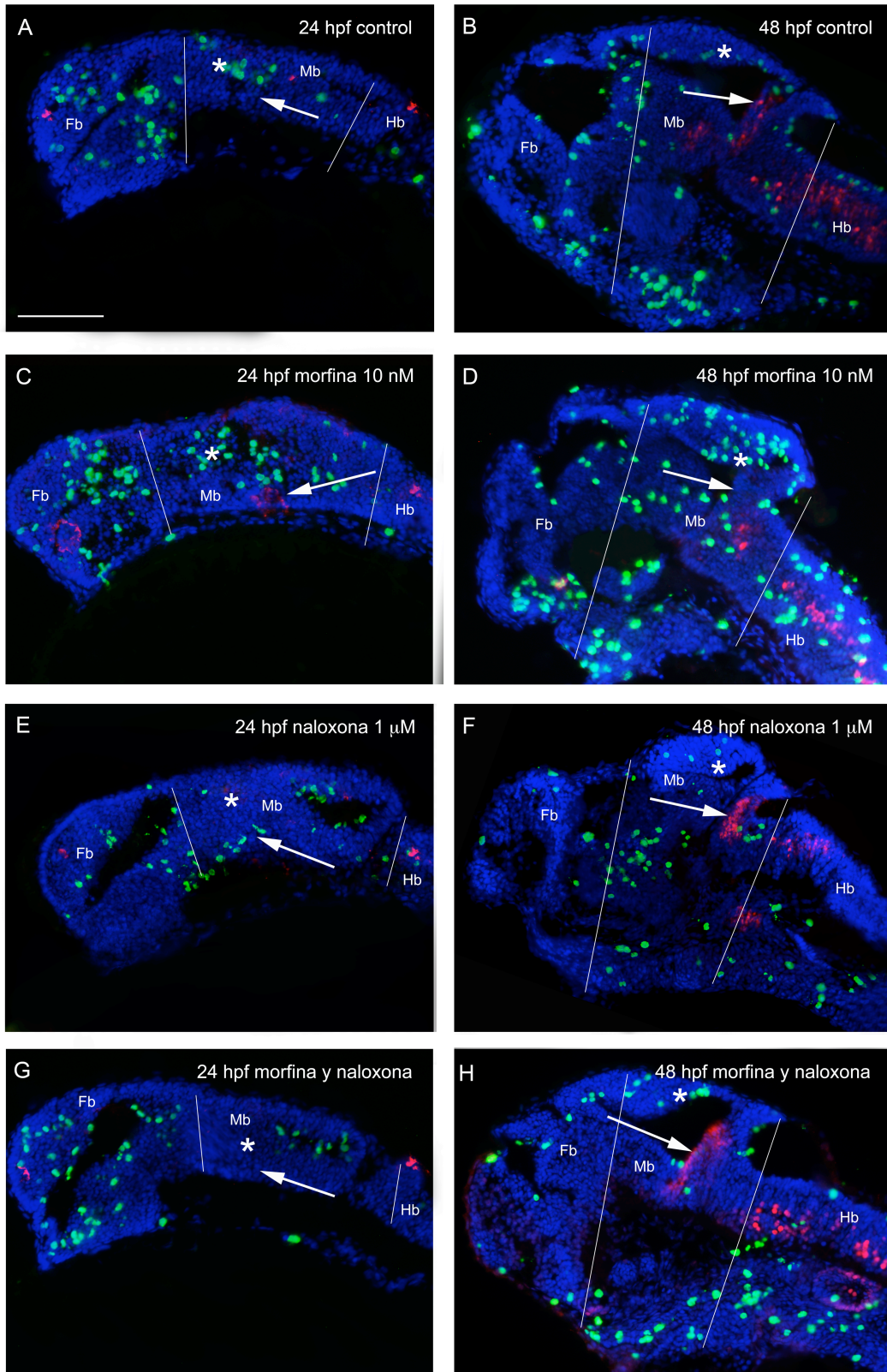


Figura 27. Análisis del efecto de la morfina sobre proliferación celular y diferenciación neuronal en embriones de 24 y 48 hpf. A) Embriones control de 24 hpf. B) Embriones control de 48 hpf. C) Embriones de 24 hpf expuestos a morfina 10 nM. D) Embriones de 48 hpf expuestos a morfina 10 nM. E) Embriones de 24 hpf expuestos a naloxona 1 μ M. F) Embriones de 48 hpf expuestos a naloxona 1 μ M. G) Embriones de 24 hpf expuestos simultáneamente a morfina y naloxona. H) Embriones de 48 hpf expuestos simultáneamente a morfina y naloxona. Fb: cerebro anterior, que incluye telencéfalo y diencéfalo; mb: mesencéfalo; hb: rombencéfalo. * regiones anatómicas en las que se producen cambios visibles en el número de células en proliferación (positivas a histona-3-fosforilada). Flecha: regiones anatómicas en las que se producen cambios visibles en el número de neuronas positivas a Pax-2.

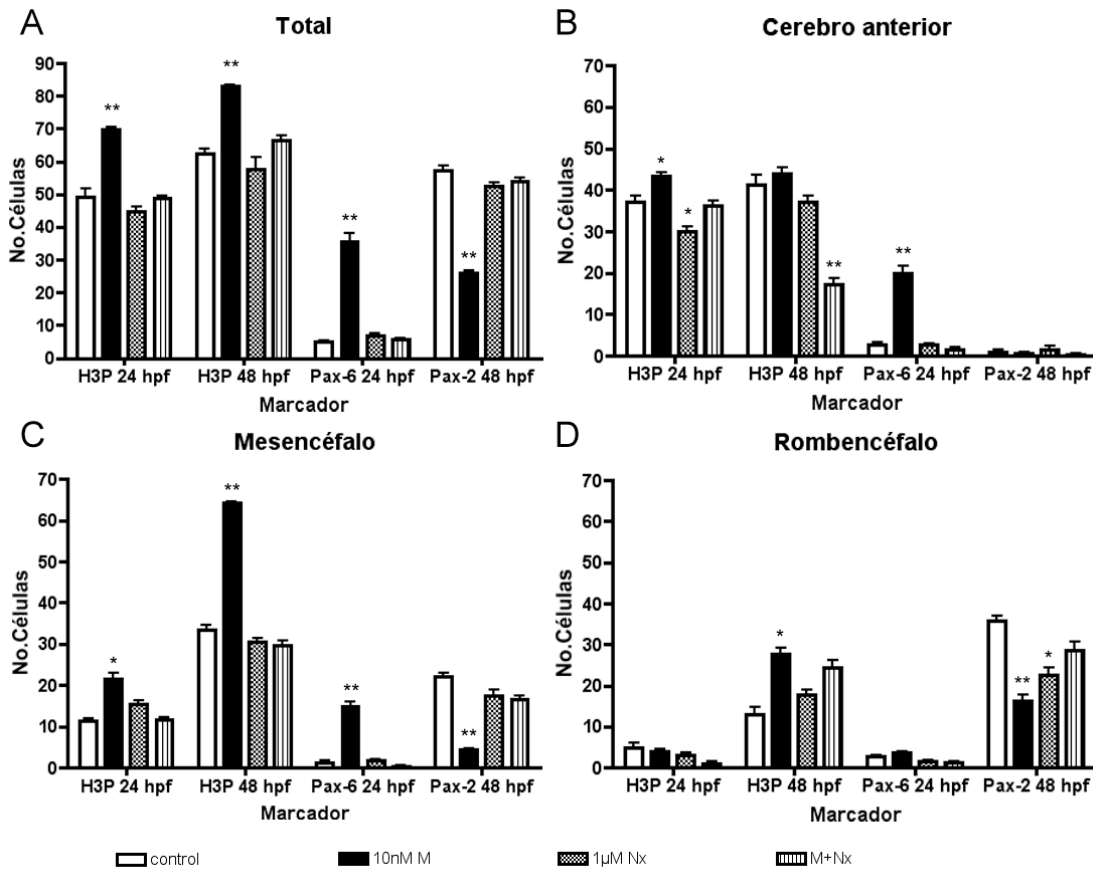


Figura 28. Representación del conteje de células proliferativas (positivas a histona-3-fosforilada, H3P) y de neuronas positivas a Pax-2 o a Pax-6, según el estadio embrionario, en todo el tubo neural (A), en el cerebro anterior (B), en el mesencéfalo (C) y en el rombencéfalo (D) de embriones de 24 y 48 hpf expuestos a morfina, naloxona y a ambas simultáneamente. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$, Test de Student con corrección de Welch.

Para realizar los estudios de neuroprotección inducida por la morfina hemos empleado glutamato con agente neurotóxico (Fig. 29). El análisis ha sido llevado a cabo en embriones de 24 hpf, porque a partir de este estadio es necesario tratar los embriones con fenil-tio-urea (PTU) para inhibir la pigmentación, y éstos no sobreviven a un tratamiento conjunto de fenil-tio-urea y glutamato. Hemos estudiado *in vivo* la prevención de daño neuronal frente a glutamato ejercida por la morfina en motoneuronas (positivas a calretinina), localizadas en la región dorso-caudal del embrión, y en neuronas positivas a Pax-6, presentes sobre todo en telencéfalo y región rostral del rombencefalo (Fig. 29A). Como se observa en la figura 29B la exposición a

morfina induce un incremento del número de neuronas de ambos tipos en el embrión. El glutamato, utilizado ampliamente como agente neurotóxico, produce la pérdida casi total de neuronas positivas a Pax-6 y una pérdida parcial de motoneuronas (Fig. 29C), un efecto que es revertido de manera exitosa por la exposición previa a morfina (Fig. 29D).

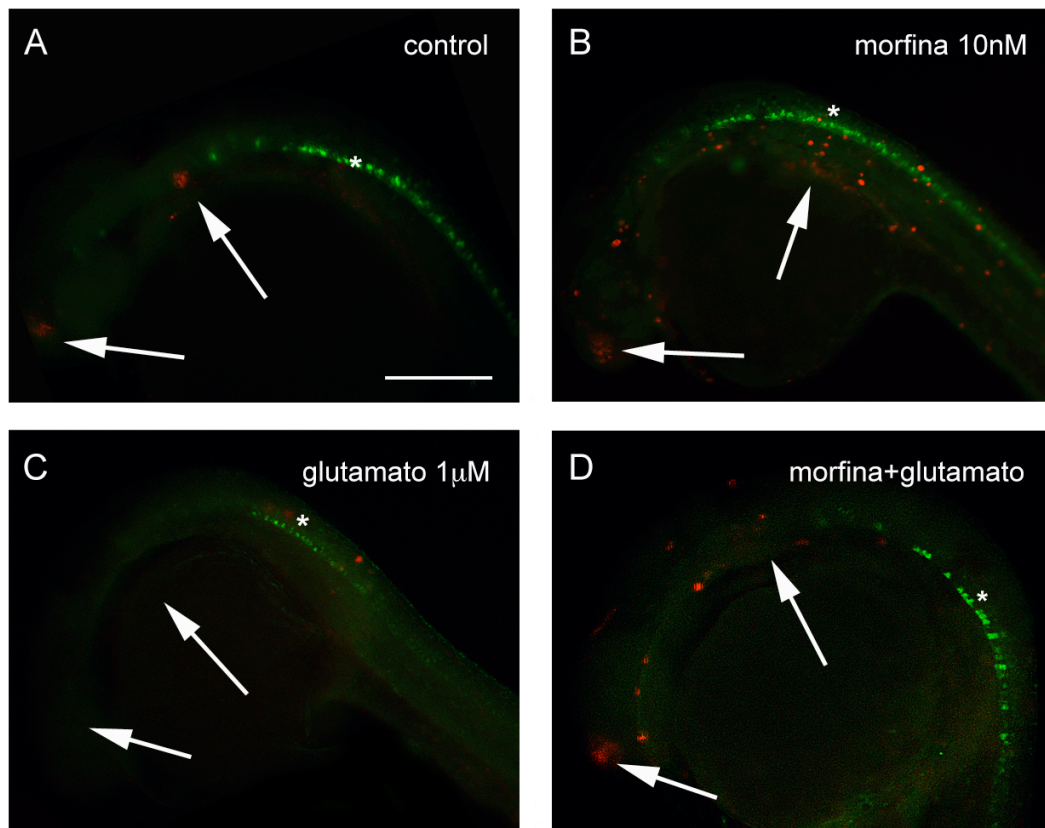


Figura 29. Análisis de la protección neuronal ejercida por la morfina frente al daño neuronal producido por la exposición a glutamato en embriones de 24 hpf. Las células marcadas en rojo corresponden a neuronas positivas a Pax-6 y las que están marcadas en verde, a motoneuronas, que positivas a calretinina. A) Embriones control. B) Embriones expuestos a morfina 10 nM, que incrementa el número de neuronas, tanto positivas a Pax-6 como a calretinina. C) Embriones expuestos a glutamato 1 μ M. La utilización de este agente tóxico hace desaparecer las neuronas positivas a Pax-6 y disminuye drásticamente las motoneuronas. D) Embriones expuestos a morfina y a glutamato. La morfina inhibe el efecto del glutamato y rescata los fenotipos neuronales estudiados.

El análisis del efecto que produce la morfina sobre la expresión de los receptores opioides es importante para abrir puertas en la investigación de posibles mecanismos de

actuación de la misma. Como se observa en las figuras 30A y 30B, la morfina no produce ningún cambio estadísticamente significativo sobre la expresión del receptor opioide μ ni a las 24 ni a las 48 hpf, al igual que la naloxona. Sin embargo, cuando los embriones son expuestos a naloxona y a morfina simultáneamente parece existir un efecto sinérgico sobre el nivel de expresión de este receptor, aunque dicho efecto es opuesto en ambos estadios embrionarios, de manera que a las 24 hpf produce un incremento en la expresión de ZfMOR y a las 48 hpf, disminuye su expresión. El efecto de la morfina sobre los receptores opioides tipo delta, también parece tener el efecto contrario según el estadio embrionario y según el tipo de receptor. A las 24 hpf, la morfina induce una sobreexpresión de ZfDOR1 (Fig. 30C), y en contraste, disminuye la expresión de ZfDOR2 (Fig. 30E). Sin embargo, a las 48 hpf la morfina reduce el número de copias de ZfDOR1 (Fig. 30D), aumentando el de ZfDOR2 (Fig. 30F). En todos estos casos, a excepción de ZfDOR2 a las 48 hpf, la naloxona produce un cambio en la expresión de los receptores opioides tipo delta similar al producido por la morfina, cuando es administrada como única sustancia, y mantiene dicho efecto, o lo incrementa, cuando morfina y naloxona son administradas conjuntamente. En relación con el receptor opioide kappa, la exposición a morfina aumenta su nivel de expresión génica tanto a las 24 (Fig. 30G) como a las 48 hpf (Fig. 30H), efecto revertido por la naloxona en ambos estadios embrionarios.

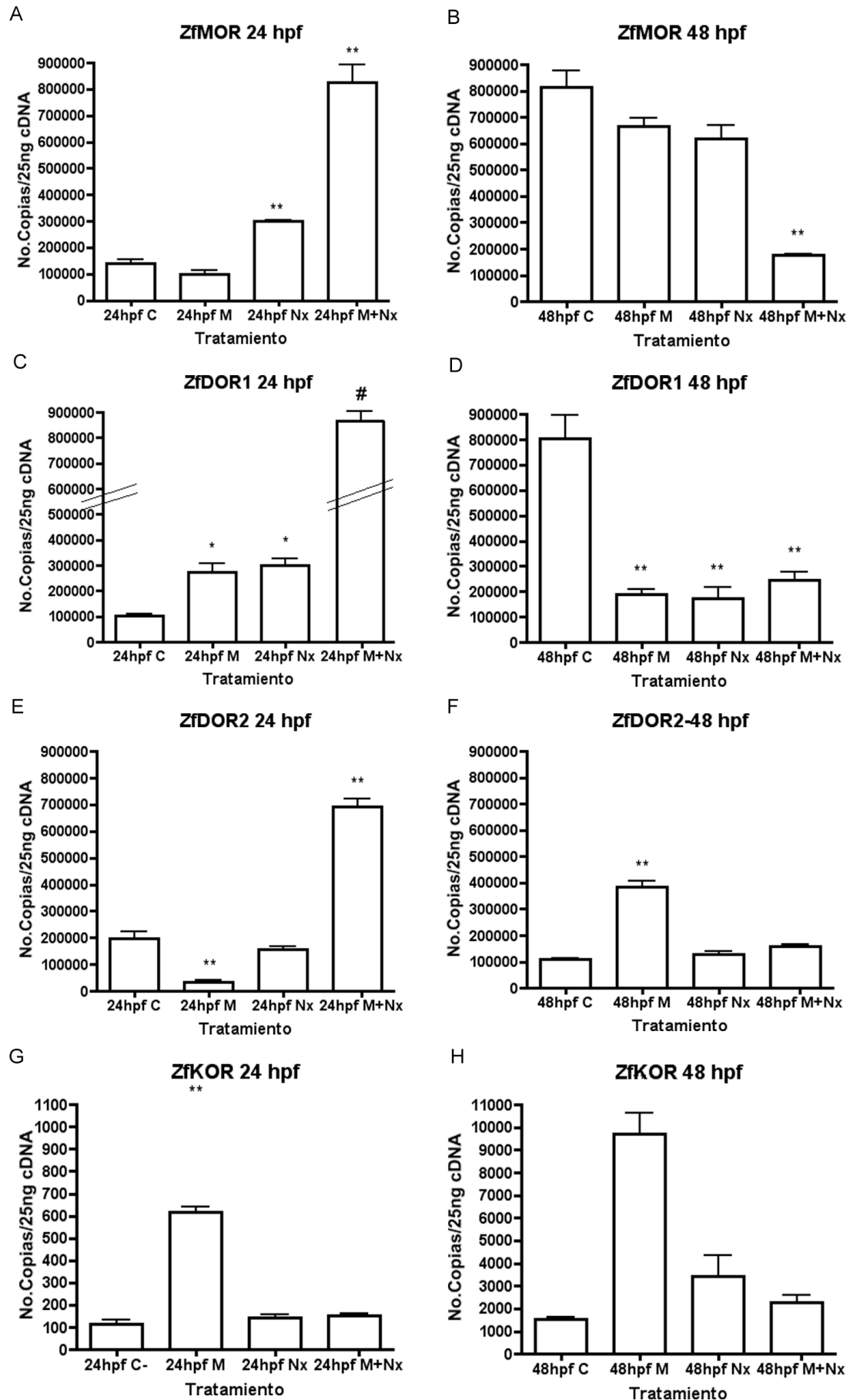


Figura 30. Influencia de la morfina en la expresión de los receptores opioides en embriones de 24 y 48 hpf. A) Cambios en la expresión de ZfMOR producidos por la morfina, naloxona y exposición simultánea a ambas sustancias en embriones de 24 hpf. B) Cambios en la expresión de ZfMOR producidos por la morfina, naloxona y exposición simultánea a ambas sustancias en embriones de 48 hpf. C) Cambios en la expresión de ZfDOR1 producidos por la morfina, naloxona y exposición simultánea a ambas sustancias en embriones de 24 hpf. D) Cambios en la expresión de ZfDOR1 producidos por la morfina, naloxona y exposición simultánea a ambas sustancias en embriones de 48 hpf. E) Cambios en la expresión de ZfDOR2 producidos por la morfina, naloxona y exposición simultánea a ambas sustancias en embriones de 24 hpf. F) Cambios en la expresión de ZfDOR2 producidos por la morfina, naloxona y exposición simultánea a ambas sustancias en embriones de 48 hpf. G) Cambios en la expresión de ZfKOR producidos por la morfina, naloxona y exposición simultánea a ambas sustancias en embriones de 24 hpf. H) Cambios en la expresión de ZfDOR2 producidos por la morfina, naloxona y exposición simultánea a ambas sustancias en embriones de 48 hpf. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$, Test de Student con corrección de Welch.

IV. 5. INFLUENCIA DE LA MORFINA SOBRE LA CASCADA DE REGULACIÓN DEL MIR-133b MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR OPIOIDE MU

En el apartado anterior se describe y analiza la implicación de la morfina en tres procesos esenciales que tienen lugar fundamentalmente durante el desarrollo embrionario: la proliferación celular, la diferenciación neuronal y la protección neuronal. Además, la morfina produce cambios en la expresión génica de los receptores opioides, que ya han sido descritos (Sección IV. 4). Todos los efectos producidos por la morfina que hemos estudiado en este trabajo son inhibidos por la naloxona, indicando que la implicación de la morfina ocurre a través de la activación de los receptores opioides. Sin embargo, aún quedan por elucidar los mecanismos reguladores de la transcripción que son afectados por la actividad de los receptores opioides, y que son los responsables últimos de los efectos de la morfina en los procesos mencionados. Por ello nos propusimos analizar los cambios de expresión de determinados micro RNAs producidos por la exposición a morfina en la etapa embrionaria, concretamente a las 24 hpf. Mediante la realización de un microarray en el que se analizaron más de 700 miRNAs pudimos determinar la existencia de un elevado número de miRNAs cuya expresión variaba en embriones expuestos a morfina. De todos ellos seleccionamos el miRNA-133b, responsable de la regulación de la expresión de genes que determinan la diferenciación neuronal a fenotipo dopaminérgico. Las neuronas dopaminérgicas están íntimamente ligadas tanto a la modulación de la sensación dolorosa como al desarrollo de adicción a las distintas drogas, por lo que mediante la regulación de su diferenciación el sistema opioide estaría implicado en ambos procesos.

En primer lugar, tras la realización del microarray y habiendo elegido el miR-133b como objeto de nuestro estudio, corroboramos el efecto que la morfina presenta en

su nivel de expresión mediante qPCR (Fig. 31). De esta manera pudimos observar que la morfina disminuye la expresión de miR-133b a dos concentraciones distintas, 1 y 10 nM. En mamíferos el miR-133b regula la expresión del factor de transcripción Pitx3, que a su vez activa la transcripción de genes que intervienen de manera activa en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas, como la tirosina-hidroxilasa (TH) y el transportador de dopamina (DAT). Por ello decidimos asimismo analizar la expresión de estos genes en embriones expuestos a morfina y determinar si la influencia que la morfina tiene sobre la expresión de miR-133b está correlacionada con los cambios de expresión que la morfina produce en Pitx3, TH y DAT. Como se puede observar en las figuras 31B, 31C y 31D, cuando la morfina disminuye la expresión de miR-133b (Fig. 31A), aumenta la de Pitx3, TH (sólo a concentración de 1 nM) y de DAT. La naloxona no tiene ningún efecto sobre la expresión de los genes estudiados, y sin embargo, cuando los embriones son expuestos a morfina y naloxona simultáneamente, el antagonista naloxona revierte el efecto de la morfina, de manera de la expresión de los genes retorna al nivel detectado en embriones control (no expuestos a morfina).

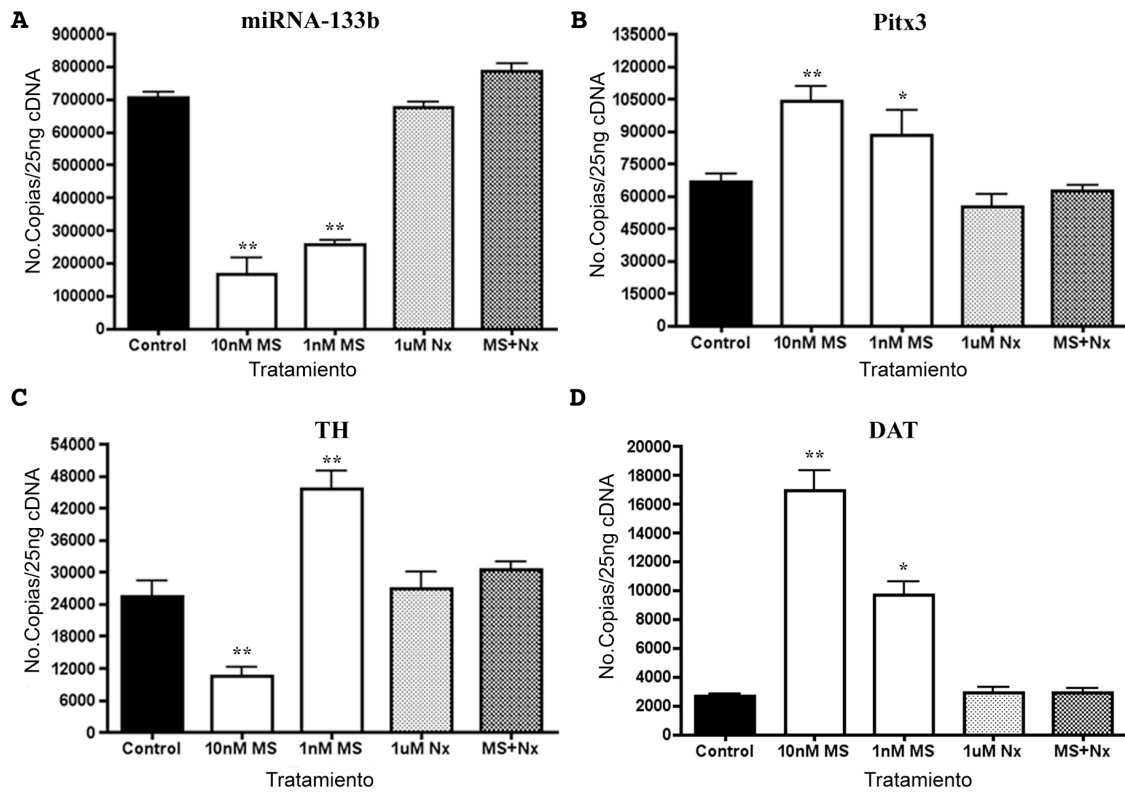


Figura 31. Influencia de la morfina (MS) en la expresión de miR-133b (A), Pitx3 (B), TH (C) y DAT (D) a las 24 hpf. El efecto de la morfina sobre la expresión de los genes analizados es inhibido en todos los casos por la naloxona (Nx) cuando los embriones se exponen simultáneamente a morfina y naloxona. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$, Test de Student con corrección de Welch.

Aunque se ha establecido Pitx3, concretamente su región 3'UTR (del inglés, untranslated region), como gen diana de miR-133b en mamíferos, esta relación no había sido determinada en el pez cebra, por lo que a pesar de que en la figura anterior el efecto de la morfina sobre la expresión de ambos genes parece relacionarlos, era necesario demostrar que el sistema de regulación de miR-133b estaba conservado en el pez cebra. Por ello hemos inyectado 100 pg del extremo 3'UTR de Pitx3 en embriones en el estadio de una célula y sacrificándolos a las 24 hpf, estadio elegido para la realización de este estudio (Fig. 32). La inyección de su diana no modifica significativamente la expresión del miR-133b (Fig. 32A), aunque por el contrario, como se observa en las figuras 32B, 32C y 32D, produce un incremento en el nivel de expresión génica tanto de

su gen diana, Pitx3, como de los genes cuya transcripción regula Pitx3, es decir, TH y DAT.

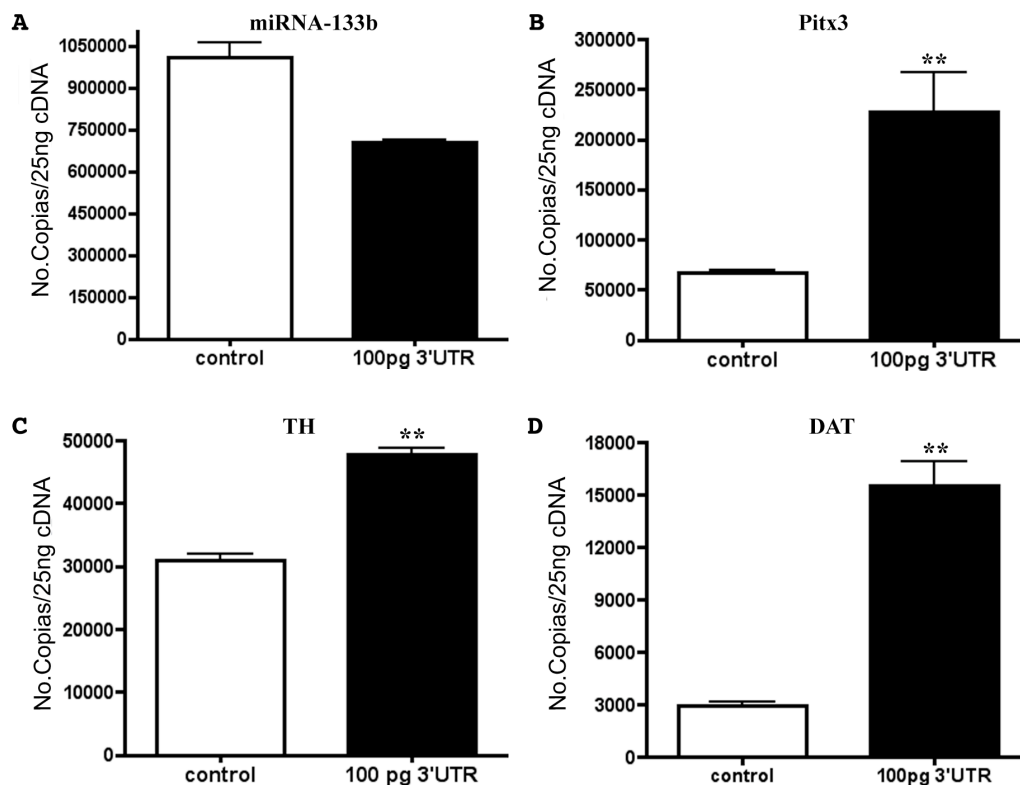


Figura 32. Efecto de la inyección del extremo 3'UTR de Pitx3 sobre la expresión del miR-133b (A), del cual es diana, sobre Pitx3 (B), TH (C) y DAT (D). ** $P \leq 0.005$, Test de Student con corrección de Welch.

Una vez analizado el efecto de la morfina sobre los genes que forman parte de la cascada de regulación inducida por miR-133b, es necesario determinar un posible mecanismo de actuación a través del cual la morfina ejerza su actividad. Dado que el receptor opioide mu es el que presenta mayor afinidad por la morfina, y considerando los estudios *in vitro* previos, que demuestran que tanto el receptor opioide mu como el receptor opioide kappa incrementan la tasa de diferenciación neuronal, hemos decidido determinar la posible implicación de la activación del receptor opioide mu por la morfina en la cascada de regulación de miR-133b. Para ello hemos silenciado este receptor utilizando la técnica de la inyección de morfolino. La ausencia del receptor opioide mu

produce un incremento en el nivel de expresión de miR-133b (Fig. 33A), y como consecuencia, disminuye el número de copias de Pitx3 (Fig. 33B), TH (Fig. 33C) y DAT (Fig. 33D). La exposición a morfina, tanto a 1 como a 10 nM no modifica el cambio en la expresión de estos genes producido por el silenciamiento del receptor opioide mu. Además de un grupo de embriones sin inyectar, hemos empleado como control de inyección embriones a los que se les ha inyectado un morfolino control, es decir, un morfolino que no se une a ningún gen, y por tanto no produce silenciamiento génico.

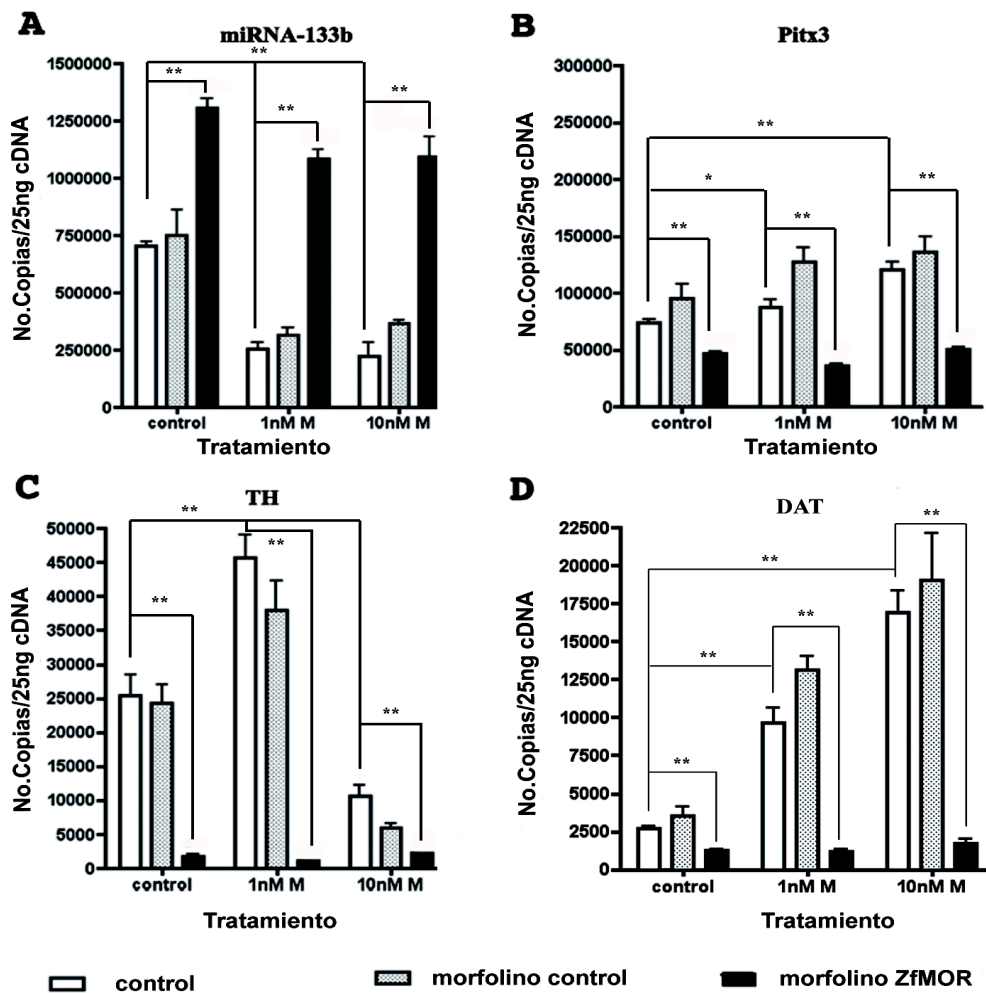


Figura 33. Efecto que tiene la ausencia del receptor opioide mu (*knockdown*) sobre la expresión de miR-133b (A), Pitx3 (B), TH (C) y DAT (D) en embriones de 24 hpf sin tratar y tratados con morfina 1 nM y 10 nM. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$, ANOVA con post-análisis de Bonferroni.

Hasta el momento hemos demostrado que la morfina actúa sobre el receptor opioide μ , que al activarse como consecuencia de la unión de su ligando, produce un aumento de la expresión de los genes que inducen la diferenciación dopaminérgica. Con el fin de profundizar en el mecanismo que regula la actividad del receptor opioide μ en su relación con miR-133b, hemos estudiado la implicación de ERK 1/2 en este proceso (Fig. 34), teniendo en consideración que esta quinasa es la señal principal de la cascada intracelular del receptor opioide μ . Para ello hemos inhibido la actividad de esta proteína utilizando dos inhibidores ampliamente conocidos: PD98059 y U0126, siendo este último más activo en el pez cebra. La ausencia de actividad de ERK 1/2 producida por los inhibidores aumenta la expresión del miR-133b (Fig. 34A), y como consecuencia, reduce el número de copias de su gen diana, Pitx3 (Fig. 34B), y de los genes cuya transcripción regula Pitx3, es decir, TH (Fig. 34C) y DAT (Fig. 34D). Este efecto es más acusado cuando el tratamiento con los inhibidores de ERK 1/2 se realiza a partir de las 16 hpf, cuando se empieza a dividir y a diferenciar el Sistema Nervioso Central. La exposición a morfina no modifica estos cambios en ningún caso.

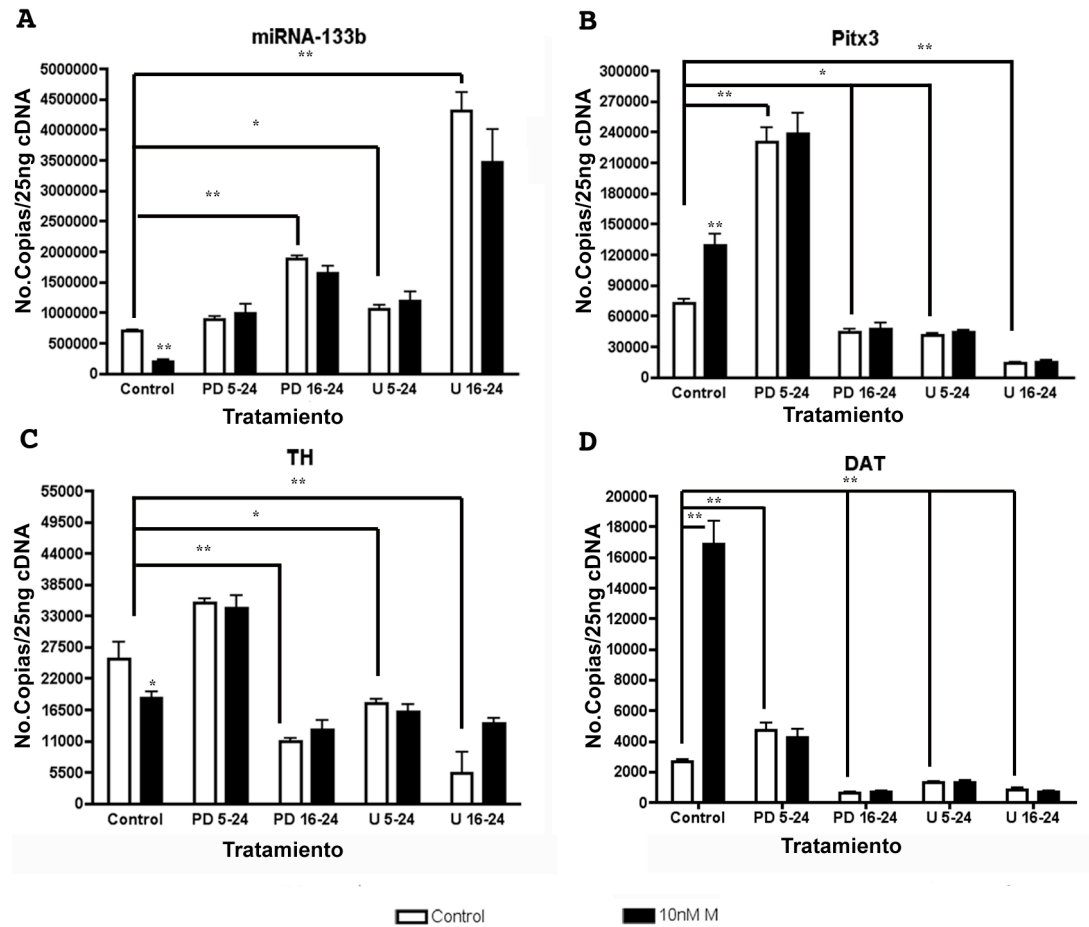


Figura 34. Efecto de la inhibición de ERK 1/2 sobre la expresión de miR-133b (A), Pitx3 (B), TH (C) y DAT (D). La inhibición se llevó a cabo con PD98059 y U0126 en periodos de 5 a 24 hpf y de 16 a 24 hpf. M: morfina 10 nM. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$, ANOVA con post-análisis de Bonferroni.

Teniendo en cuenta estos resultados podemos decir que hemos establecido un mecanismo a través del cual la morfina induce un aumento en la tasa de diferenciación neuronal, concretamente hacia el fenotipo dopaminérgico. Sin embargo, queda por elucidar si la morfina produce este mismo efecto en mamíferos. Con el objeto de extrapolar nuestros resultados a modelos experimentales más cercanos evolutivamente al hombre, hemos analizado la influencia de la morfina en la expresión de miR-133b en neuronas de hipocampo de rata recién nacida (estadio P1) (Fig. 35). Se puede apreciar en la figura 35A que la morfina produce un aumento en la expresión de este miR-133b en neuronas inmaduras (1 semana), que es revertido por la naloxona. Sin embargo, en

neuronas maduras, de 3 semanas, el tratamiento con morfina no produce cambios significativos en la expresión de miR-133b (Fig. 35B)s.

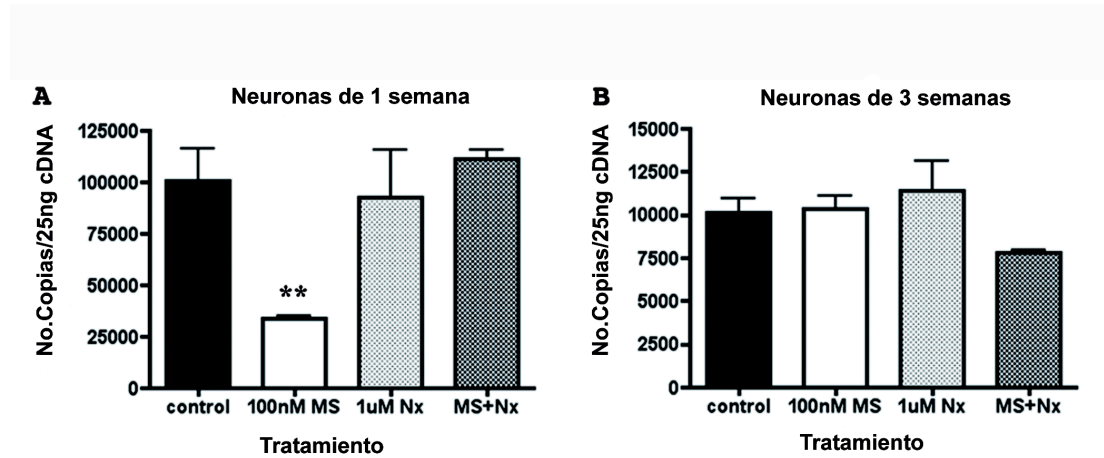


Figura 35. Influencia de la morfina sobre la expresión de miR-133b en neuronas de hipocampo de rata inmaduras (A) y maduras (B). La morfina disminuye la expresión del miR-133b sólo en las neuronas inmaduras, de una semana (A), mientras que en las neuronas maduras, la morfina no produce ningún efecto sobre la expresión de este miRNA (B). La naloxona inhibe la acción de la morfina, por lo que se considera que la influencia de la morfina sobre la expresión del miR-133b tiene lugar a través de la activación de receptores opioides. ** $P \leq 0.005$, Test de Student con corrección de Welch.

IV. 6. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA DE LA MORFINA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES OPIOIDES TIPO DELTA Y SU RELACIÓN CON EL MIR-133b Y SUS GENES DIANA

El receptor opioide tipo delta está implicado en la protección de neuronas tanto frente a agentes excitotóxicos, como el glutamato, como frente a daños producidos por isquemia. Esta capacidad neuroprotectora del receptor opioide delta sólo ha sido demostrada *in vitro* (Narita et al., 2006; Zhang et al., 2000), de manera que aunque estos estudios han colaborado en la adquisición de nuevos conocimientos sobre la funcionalidad de este receptor, aún no se ha establecido con profundidad su actividad *in vivo* con respecto a la neuroprotección. El trabajo aquí presentado demuestra que la morfina tiene actividad neuroprotectora *in vivo*, y asimismo, cuando actúa a través del receptor opioide mu, potencia la diferenciación dopaminérgica. Considerando la influencia que la morfina ejerce sobre la expresión de los receptores opioides delta del pez cebra, es posible que la capacidad de protección neuronal atribuida a la morfina sea consecuencia de la activación de los receptores opioides delta por este agonista inespecífico, a pesar de la escasa afinidad que presenta la morfina por los receptores opioides delta de pez cebra. Para llevar a acabo este estudio, hemos centrado nuestra atención en la protección de las neuronas dopaminérgicas dada su importancia en el desarrollo de la adicción. Además, al conocer un posible mecanismo (miR-133b) que regula la diferenciación de estas neuronas, establecemos la influencia de la activación de los receptores opioides delta por la morfina en este circuito, abriendo nuevas puertas al estudio de diferentes mecanismos de actuación del sistema opioide que ayudarán a clarificar la confluencia entre la capacidad analgésica de los opioides y su capacidad para producir adicción.

Como se puede observar en la figura 36, el silenciamiento de ZfDOR2, al igual que el silenciamiento de MOR, induce un aumento de expresión del miRNA (Fig. 36A), aunque al contrario que la ausencia del receptor opioide mu, dicho aumento es modificado por la exposición a morfina, de manera que este agonista, de alguna manera ejerce su función de disminuir la expresión del miRNA, lo que corrobora que la morfina está implicada en la regulación de la expresión del miR-133b a través del receptor opioide mu y no del delta. Sin embargo, ZfDOR1 parece tener un efecto sobre el nivel de expresión génica del miRNA que hemos estudiado. A medida que aumenta la expresión del miRNA, disminuye el nivel de expresión de su gen diana, Pitx3 (Fig. 36B), así como los genes cuya transcripción regula Pitx3, es decir, TH (Fig. 36C) y DAT (Fig. 36D).

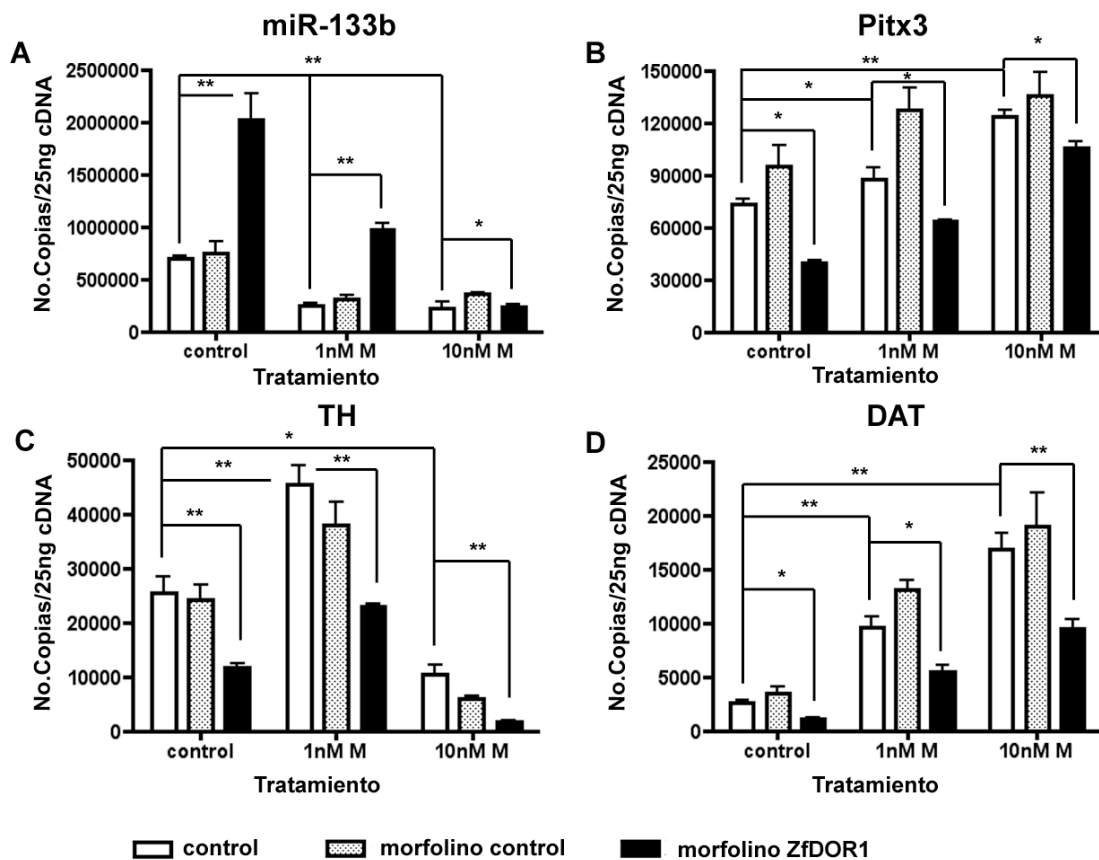


Figura 36. Efecto del silenciamiento del receptor opioide ZfDOR1 sobre la expresión de miR-133b (A), Pitx3 (B), TH (C) y DAT (D) y sobre el efecto de la morfina en dicha expresión. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$, ANOVA con post-análisis de Bonferroni.

En el caso del silenciamiento de ZfDOR2 (Fig. 37), el efecto que produce dicho silenciamiento es similar al descrito cuando se silencia el receptor opioide delta 1, es decir, su ausencia incrementa el nivel de expresión génica del miRNA, y reduce la expresión génica de sus genes diana, aunque la morfina modula estas variaciones.

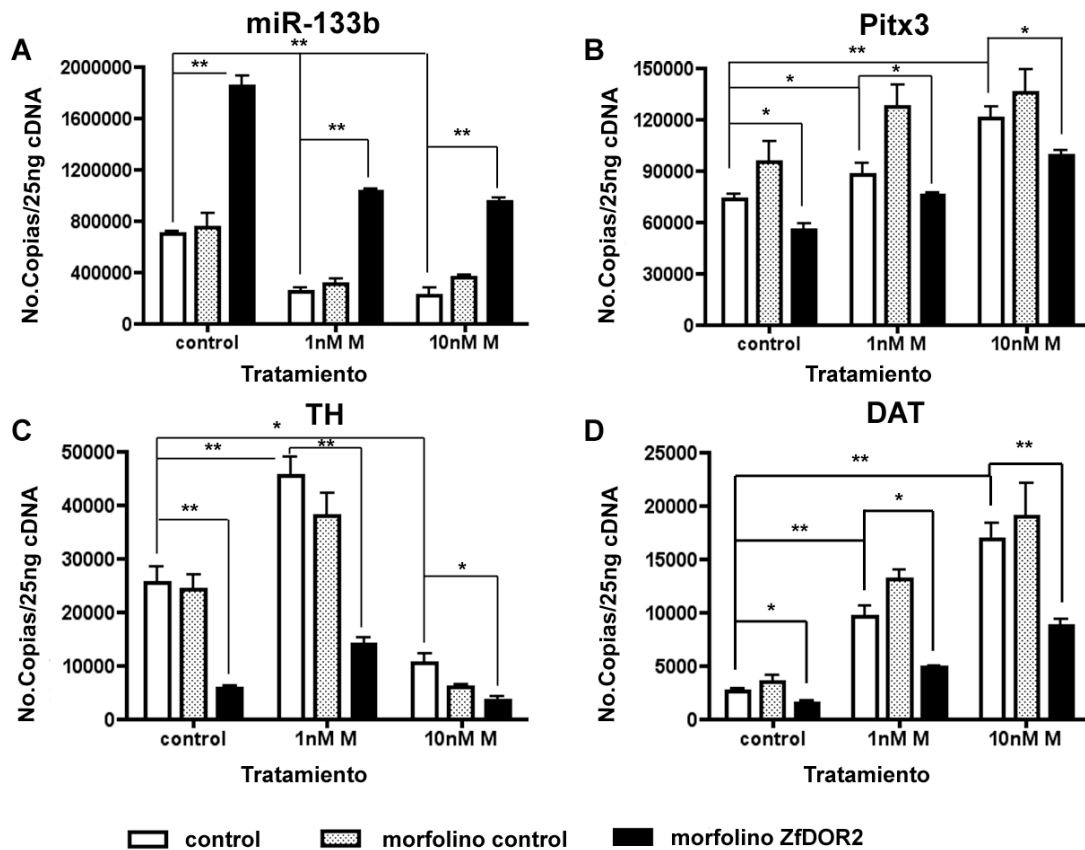


Figura 37. Efecto del silenciamiento del receptor opioide ZfDOR1 sobre la expresión de miR-133b (A), Pitx3 (B), TH (C) y DAT (D) y sobre el efecto de la morfina en dicha expresión. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$, ANOVA con post-análisis de Bonferroni.

Sin embargo, cuando se silencian ambos receptores delta simultáneamente, el efecto sobre la expresión del miRNA y de los genes regulados por él es similar al observado tras el silenciamiento del receptor opioide mu, es decir, la morfina no ejerce ningún efecto sobre estos cambios, indicando que la presencia y actividad de ambos

receptores es necesaria para ejercer su influencia sobre la cascada de regulación transcripcional del miRNA-133b (Fig. 38).

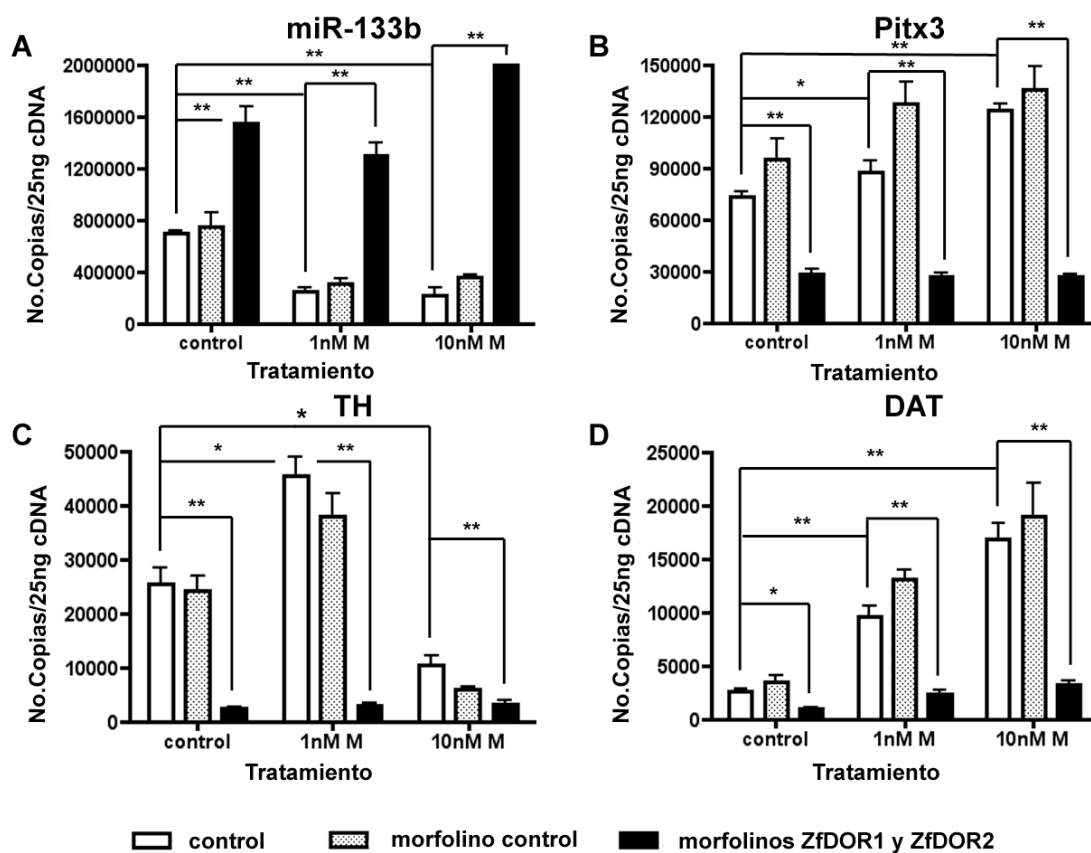


Figura 38. Influencia del silenciamiento simultáneo de los receptores opioides tipo delta, 1 y 2, sobre la expresión de miR-133b (A), Pitx3 (B), TH (C) y DAT (D) y sobre el efecto de la morfina en dicha expresión. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$, ANOVA con post-análisis de Bonferroni.

Dada la implicación del receptor opioide delta de mamíferos en protección neuronal, y teniendo en cuenta la influencia que los receptores delta parecen tener sobre la regulación de la expresión del miRNA-133b y sus genes diana, hemos analizado si esta influencia determina alguna implicación en la protección de neuronas dopaminérgicas (Fig. 39). En embriones en los que no se ha inyectado ningún morfolino, la morfina incrementa el número de neuronas dopaminérgicas. El glutamato las hace desaparecer, y la morfina inhibe el efecto del glutamato, y recupera cierto número de neuronas dopaminérgicas. La ausencia de un receptor delta no parece tener

gran efecto sobre el número de neuronas dopaminérgicas en embriones sin tratar, y la morfina incrementa dicho número. Sin embargo, la morfina no es capaz de inhibir el efecto neurotóxico del glutamato en estas neuronas. Sólo la ausencia de ambos receptores delta disminuye visiblemente el número de neuronas dopaminérgicas en embriones sin tratar, aunque la morfina incrementa en menor medida dicho número.

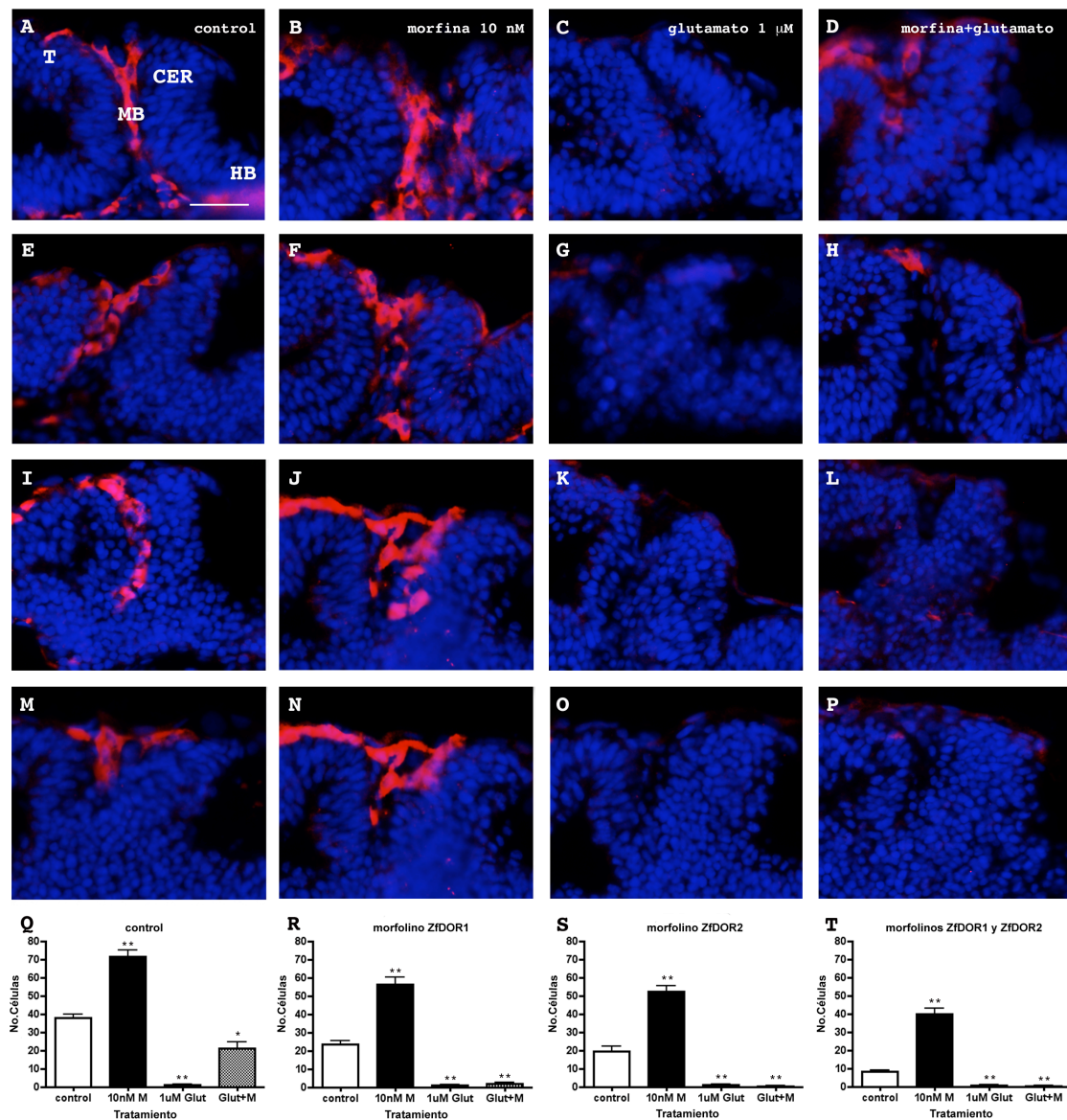


Figura 39. Influencia del silenciamiento de ZfDOR1, ZfDOR2, de ambos receptores simultáneamente sobre el papel neuroprotector de la morfina frente a la pérdida de neuronas dopaminérgicas causada por la exposición a glutamato. A) Embriones control sin inyectar. B) Embriones sin inyectar expuestos a morfina 10 nM. C) Embriones sin inyectar expuestos a glutamato 1 μ M. D) Embriones sin inyectar expuestos a morfina y glutamato. E) Embriones control inyectados con MO ZfDOR1. F) Embriones inyectados con MO ZfDOR1 expuestos a morfina 10 nM. G) Embriones inyectados con MO ZfDOR1 expuestos a glutamato 1 μ M. H) Embriones inyectados con MO ZfDOR1 expuestos a glutamato y a morfina simultáneamente. I) Embriones control inyectados con MO ZfDOR2. J) Embriones inyectados con MO ZfDOR2 expuestos a morfina 10 nM. K) Embriones inyectados con MO ZfDOR2 expuestos a glutamato 1 μ M. L) Embriones inyectados con MO ZfDOR1 expuestos a glutamato y a morfina simultáneamente. M) Embriones control inyectados con MO ZfDOR1 y con MO ZfDOR2. N) Embriones inyectados con MO ZfDOR1 y con MO ZfDOR2 expuestos a morfina 10 nM. O) Embriones inyectados con MO ZfDOR1 y con MO ZfDOR2 expuestos a glutamato 1 μ M. P) Embriones inyectados con MO ZfDOR1 y con MO ZfDOR2 expuestos a glutamato y morfina simultáneamente. Barra de escala: 50 μ m. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$, Test de Student con corrección de Welch.

IV. 7 ESTUDIO DE SISTEMAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR CUYA TRANSCRIPCIÓN PUEDE SER REGULADA POR EL SISTEMA OPIOIDE

La unión de un agonista opioide a su receptor provoca la activación de una cadena de señalización intracelular que finaliza en el núcleo con la regulación de la transcripción de determinados genes que son los responsables últimos de los efectos producidos por las diversas sustancias opioides, tanto exógenas como endógenas. El análisis de dichos genes contribuirá a determinar con mayor precisión los mecanismos a través de los cuales los opioides actúan con la mayor potencia analgésica conocida en la actualidad, y sin embargo, su administración crónica produce graves efectos adversos, siendo el más problemático, desde el punto de vista médico y social, el desarrollo de adicción. En la última etapa de este trabajo de investigación hemos comenzado a estudiar la influencia que los opioides tienen sobre la regulación de dos cascadas de señalización imprescindibles en el desarrollo embrionario:

1. Wnt1: La elección de Wnt1 como posible diana de la actividad opioide está basada en la implicación de Wnt1 en proliferación. La expresión de Wnt1 está relacionada con el aumento del número de células en proliferación, al igual que la morfina, siendo considerado incluso un marcador tumoral en ciertos tipos de neoplasias (Kumar et al., 2010).
2. Notch: La cascada de señalización de Notch es una de las más importantes en la determinación de una estirpe neuronal. Está implicado en decisiones binarias, es decir, en un grupo de precursores neuronales, Notch determina si cada uno de ellos se diferencia o no a neurona, y dependiendo de la región

anat3mica en la que se localicen los precursores neuronales, se diferencian espec3ficamente en un tipo neuronal concreto.

IV. 7-1 Influencia del sistema opioide en la expresi3n de Wnt1

Con el objeto de determinar inicialmente los estadios del desarrollo embrionario en los que el perfil de expresi3n g3nica de los receptores opioides y Wnt1 son similares, hemos cuantificado mediante PCR a tiempo real el perfil de transcripci3n de Wnt1 a lo largo del desarrollo embrionario del pez cebra. Como se observa en la figura 40, la expresi3n g3nica de Wnt1 var3a a lo largo del desarrollo, siendo mayor el n3mero de copias por 25 ng de cDNA a las 0.5 hpf (expresi3n de origen materno) y a final del periodo de Gastrulaci3n (8hpf). Durante la Segmentaci3n, la expresi3n de Wnt1 aumenta progresivamente desde las 100000 copias detectadas a las 12 hpf hasta las casi 400000 copias detectadas en el estadio de 22 hpf. Este incremento de la transcripci3n de Wnt1 durante la subdivisi3n y maduraci3n del Sistema Nervioso Central se observa tambi3n en los perfiles de expresi3n g3nica de los receptores opioides, sobre todo del receptor opioide mu, como ha sido expuesto anteriormente.

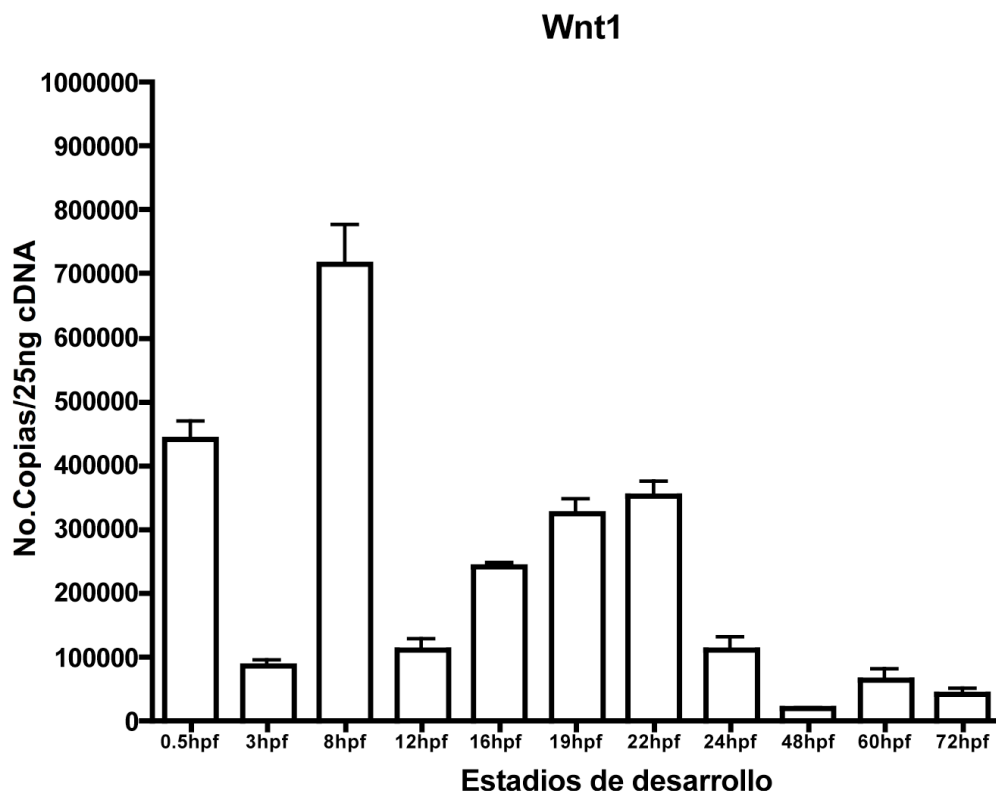


Figura 40. Cuantificación de la expresión génica de Wnt1 durante el desarrollo embrionario del pez cebra, desde las 0.5 hpf hasta las 72 hpf, estadio de eclosión. Se pueden apreciar dos picos claros de expresión, a las 0.5 hpf y a las 8 hpf, aunque existe un incremento progresivo de la expresión de Wnt1 durante el periodo de Segmentación (16-24 hpf), que finaliza con el inicio del periodo de Faríngrula (24 hpf).

La determinación del perfil de expresión de Wnt1 nos ha permitido establecer que dado que los receptores opioides y Wnt1 comparten el perfil de expresión, al menos durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central, es posible que ambos sistemas interactúen para llevar a cabo sus funciones en esos estadios embrionarios. Por ello, continuando nuestra hipótesis de la regulación opioide de la señalización de Wnt1, hemos analizado la influencia que pueden tener los opioides sobre la expresión de Wnt1 en estadios clave del desarrollo: 8 hpf (fin de Gastrulación), 16 hpf (inicio de la subdivisión del Sistema Nervioso Central), 19 hpf (inicio de la diferenciación neuronal), 24 hpf (fin del periodo de subdivisión del Sistema Nervioso Central), 48 hpf (fin de la organogénesis) y 72 hpf (último estadio del desarrollo embrionario). Hemos empleado en este estudio tres agonistas opioides: la morfina, considerado el agonista opioide más

versátil; MEGY (Met-Enkephalin-Gly-Tyr), un agonista endógeno de los receptores opioides delta, con mayor afinidad farmacológica hacia ZfDOR2; y SNC80, un agonista opioide sintético del receptor opioide delta de mamífero y que presenta escasa afinidad por los receptores opioides del pez cebra. Mediante la exposición de embriones de pez cebra a los mencionados opioides y el estudio de su influencia en la expresión de Wnt1 en los distintos estadios nuestros resultados nos proporcionan una información valiosa sobre las posibilidades de interacción y abre una puerta a la realización de estudios futuros que profundicen en los mecanismos que se ponen en marcha tras la activación de los receptores opioides y de las rutas de señalización que llegan al núcleo y regulan la transcripción génica.

En embriones de 8 hpf, tanto la morfina como MEGY disminuyen la expresión génica de Wnt1. SNC80 no parece tener ningún efecto sobre esta expresión (Fig. 41A). En el estadio en el que comienza la subdivisión del Sistema Nervioso Central, a las 16 hpf, la morfina incrementa el nivel de expresión de Wnt1, y sin embargo, tanto MEGY como SNC80 lo disminuyen (Fig. 41B). Por el contrario, a las 19 hpf, la exposición de embriones a MEGY incrementa el número de copias de Wnt1 (Fig. 41C). La morfina no induce cambios en la expresión de Wnt1 y la exposición a SNC80 la reduce. A las 24 hpf, la morfina es el único agonista opioide que aumenta el nivel de transcripción de Wnt1, mientras que MEGY y SNC80 no alteran el nivel detectado en el grupo control (Fig. 41D). En los estadios finales del desarrollo, 48 y 72 hpf, cuando la expresión de Wnt1 es menor, tanto la morfina como MEGY inducen un aumento en su nivel de transcripción (Figs. 41 E y F).

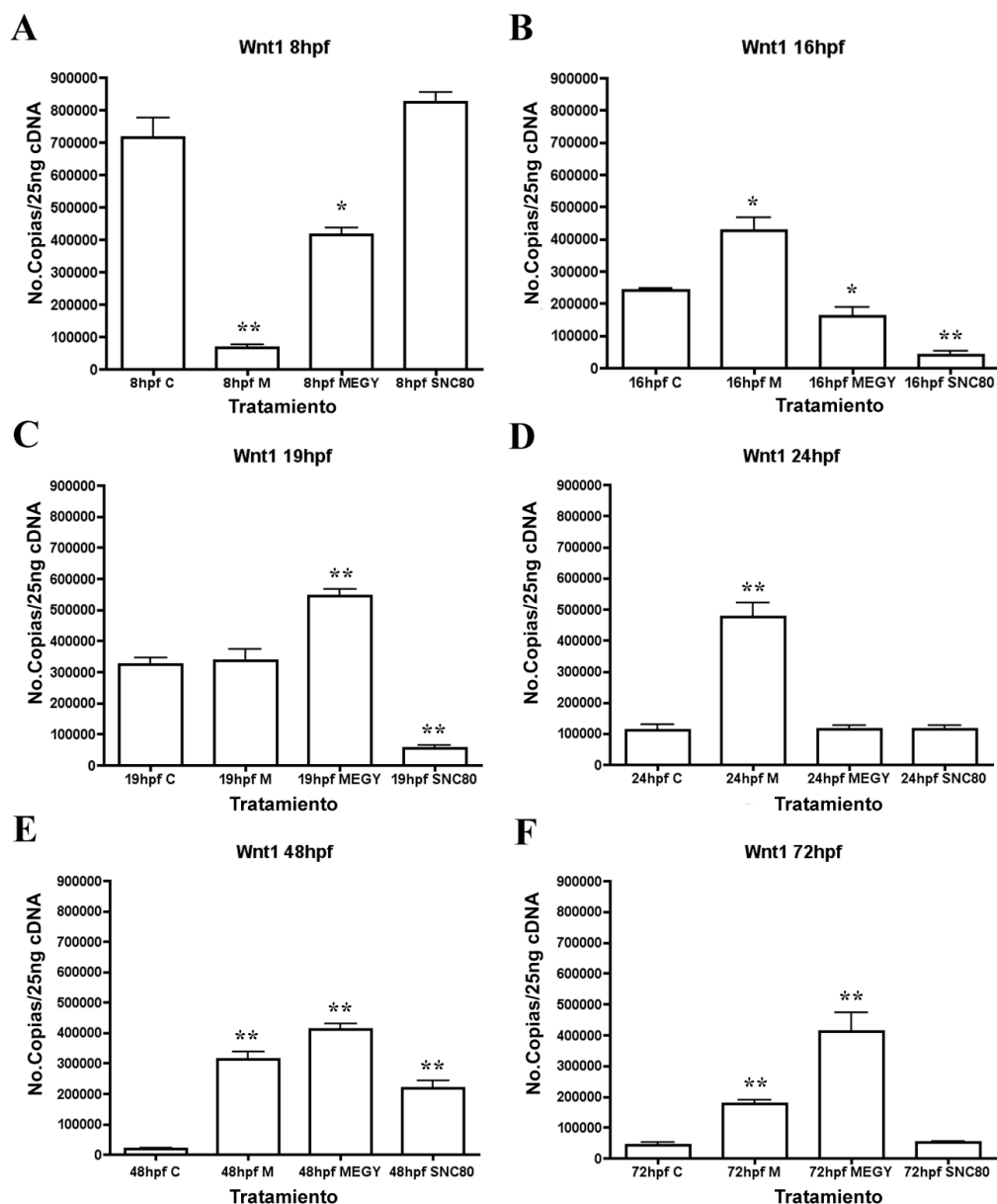


Figura 41. Análisis de los cambios en la expresión de Wnt1 producidos por la morfina (M), MEGY y SNC80 en embriones de 8 hpf (A), 16 hpf (B), 19 hpf (C), 24 (D), 48 (E), 72 (F). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$, Test de Student con corrección de Welch.

Los cambios en los niveles de expresión génica producidos por la exposición de embriones de pez cebra a morfina, MEGY y SNC80, detectados mediante PCR a tiempo real, son también apreciados mediante hibridación in situ, concretamente a las 24 y 48 hpf, estadios importantes, el primero por constituir el final del periodo de Segmentación, en el que se desarrolla el Sistema Nervioso Central, y el segundo porque

se describe como el final de la organogénesis, y en él, la mayor parte de tipos neuronales están ya diferenciados, y los núcleos cerebrales están ya formados. Como se puede observar en las figuras 42 A y B, Wnt1 a las 24 hpf se encuentra distribuido fundamentalmente en el techo óptico, el primordio de la epíffisis, continuando por la línea medial hasta la región que divide el mesencéfalo del rombencéfalo y el rombencéfalo. En las figuras 42C, 42D, 42E y 42F, se aprecia un aumento de la detección de Wnt1 en ambas regiones producido por la exposición a MEGY y a morfina, aunque resulta más evidente en el techo óptico y en rombencéfalo. Sin embargo, la exposición a los opioides no modifica la distribución de Wnt1 en el embrión.

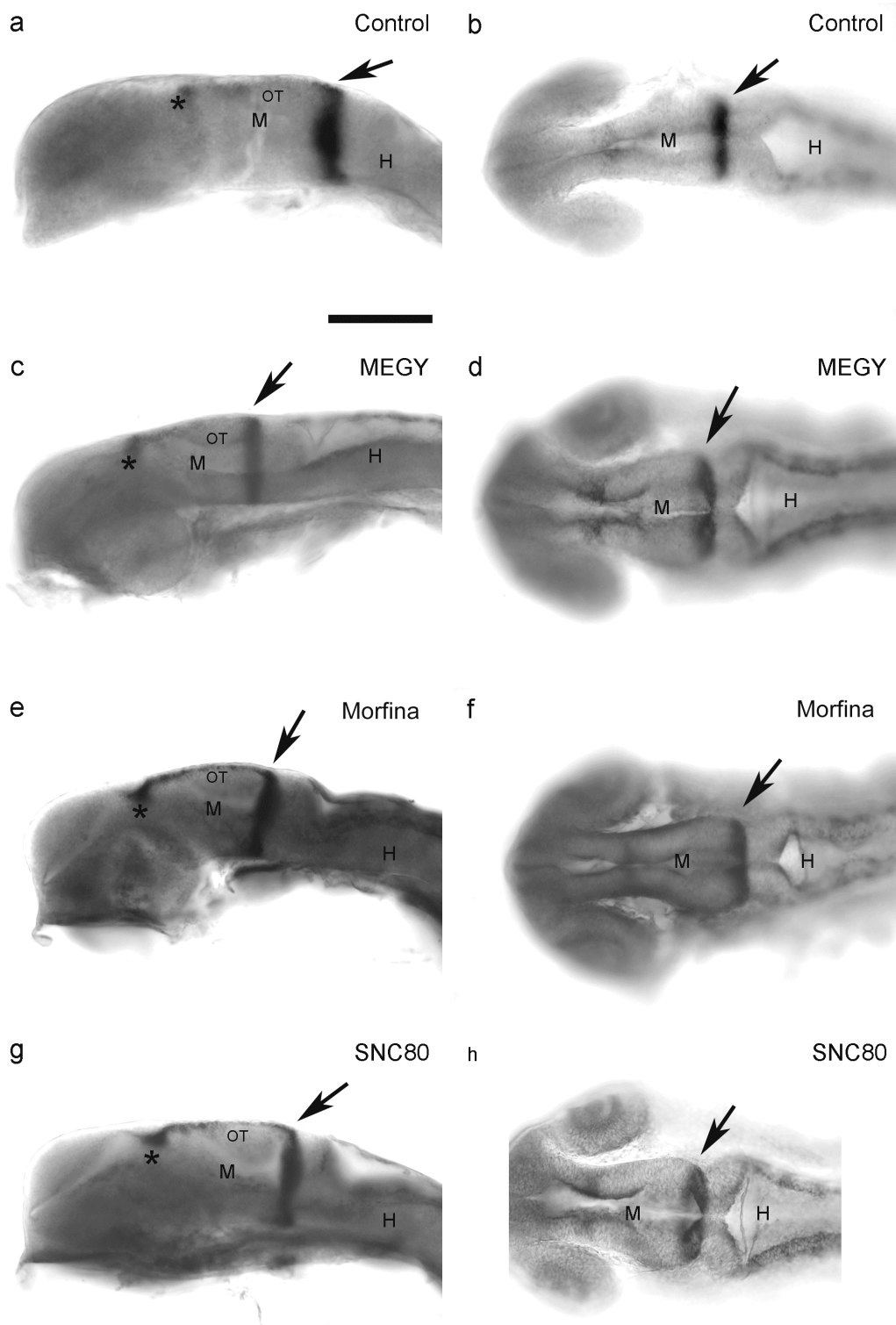


Figura 42. Distribución de Wnt1 en embriones de 24 hpf control (A,B), expuestos a morfina (C, D), expuestos al opioide endógeno MEGY (E, F) y expuestos al agonista delta-específico SNC80 (G, H). OT: techo óptico; M: mesencéfalo; H: rombencéfalo; * expresión de Wnt1 en epífisis. Flecha: Expresión de Wnt en la línea divisoria entre mesencéfalo y rombencéfalo. Barra de escala: 200 μ m.

A las 48 hpf Wnt1 se localiza en las mismas regiones que a las 24 hpf: techo óptico, epífisis y región limitante entre el mesencéfalo y el rombencéfalo (Figs. 43 A y B). También en este estadio embrionario la morfina y MEGY inducen una detección mayor de Wnt1 en las regiones de expresión en las que de manera fisiológica se encuentra, aunque no modifican su distribución. Sin embargo, a pesar que ambos opioides incrementan la detección de Wnt1, la morfina induce cambios en la intensidad del marcaje más evidentes en la epífisis, y MEGY en la región más anterior del techo óptico (Figs. 43 C, D, E y F). La exposición a SNC80 no produce cambios ni en la distribución, ni en el nivel de expresión de Wnt1.

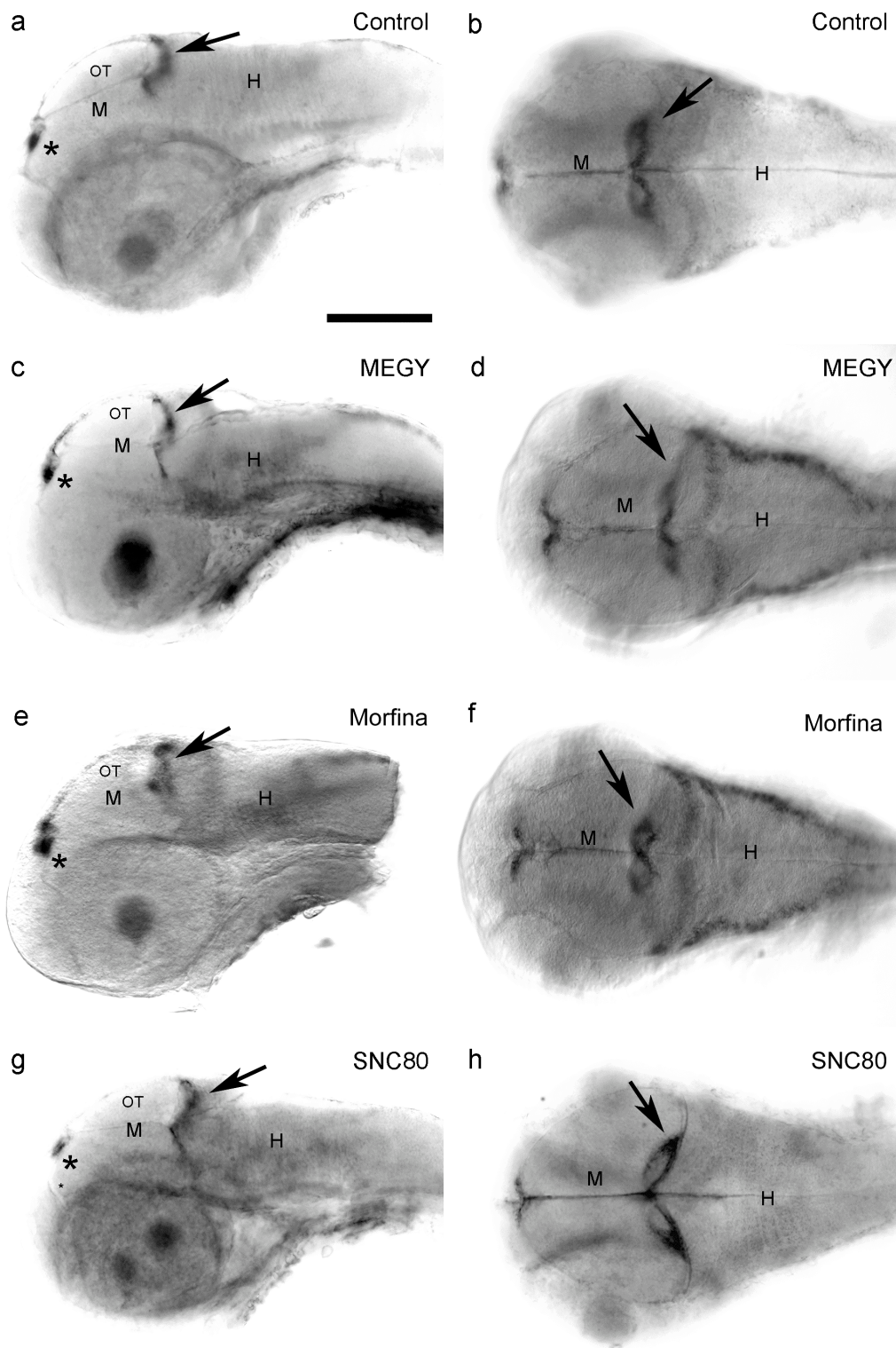


Figura 43. Distribución de Wnt1 en embriones de 48 hpf control (A,B), expuestos a morfina (C, D), expuestos al opioide endógeno MEGY (E, F) y expuestos al agonista delta-específico SNC80 (G, H). OT: techo óptico; M: mesencéfalo; H: rombencéfalo; * expresión de Wnt1 en epífisis. Flecha: Expresión de Wnt en la línea divisoria entre mesencéfalo y rombencéfalo. Barra de escala: 200 μ m

IV. 7-2 Implicación del sistema opioide en la señalización de Notch

Los resultados que presentamos a continuación corresponden a los últimos experimentos realizados como parte de esta Tesis Doctoral, y aunque son preliminares, abren un interesante camino de investigación que profundizaría en el conocimiento de otro posible mecanismo a través del cual el sistema opioide interviene en la neurogénesis y diferenciación neuronal, además del control que ejerce el receptor opioide μ sobre la cascada de regulación del miR-133b, y por tanto, de la diferenciación de neuronas dopaminérgicas.

En las figuras 44, 45 y 46 se representa el efecto que tiene tanto la exposición a morfina como el silenciamiento de los receptores μ , delta 1 y delta 2 de pez cebra, sobre la expresión de los ligandos de Notch, Delta A y Delta D, y del gen diana de Notch Her 15.

Delta A se localiza en la mayor parte del tubo neural, sobre todo en mesencéfalo y rombencéfalo (Fig. 44A). En la imagen se pueden observar asimismo neuronas dopaminérgicas (rojo) en los ganglios basales. La exposición a morfina no parece incrementar la intensidad o la distribución de Delta A en el embrión, aunque sí aumenta el número de neuronas dopaminérgicas (Fig. 44B). Como se ha descrito anteriormente, el receptor opioide μ regula la diferenciación dopaminérgica, de manera que su ausencia induce la pérdida de este tipo neuronal, como se aprecia en la figura 44C, que coincide con una disminución en la expresión de Delta A, fundamentalmente en el mesencéfalo. El silenciamiento de los duplicados delta por separado reduce la intensidad del marcaje de la expresión de Delta A, y paralelamente, el número de neuronas dopaminérgicas, aunque no desaparecen (Figs. 44 D y E). Por el contrario, cuando ambos duplicados se silencian simultáneamente, el efecto observado es similar al descrito cuando se silencia el receptor opioide μ , es decir, se elimina la expresión de

Delta A en la región central del mesencéfalo, aunque la pérdida de marcaje es menor, y disminuye drásticamente el número de neuronas dopaminérgicas de los ganglios basales (Fig. 44F).

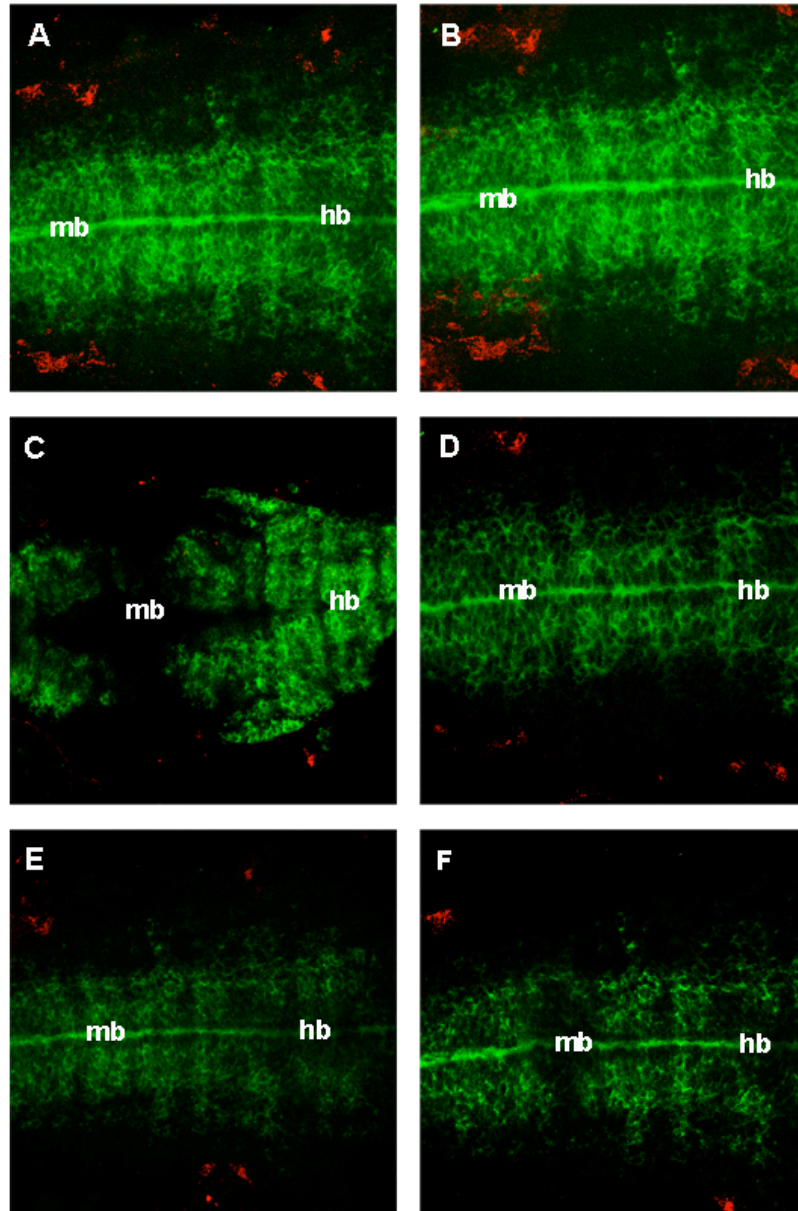


Figura 44. Expresión del ligando Delta A de Notch (Verde) y TH (rojo) en embriones de pez cebra en el estadio de 24 hpf. A) control. B) embriones expuestos a morfina 10 nM. C) Embriones en los que se les ha silenciado ZfMOR. D) Embriones en los que se les ha silenciado ZfDOR1. E) Embriones en los que se les ha silenciado ZfDOR2. F) Embriones en los que se les han silenciado simultáneamente ZfDOR1 y ZfDOR2. mb: mesencéfalo; hb: rombencéfalo. Fotografías obtenidas con microscopio confocal Leica SP5.

La distribución de Delta D en embriones del grupo control es similar a la de Delta A: se localiza a lo largo del tubo neural, siendo el marcaje más intenso en las regiones caudales, es decir, mesencéfalo y rombencéfalo, según se puede observar en la figura 45A. La exposición de los embriones a una concentración 10 nM de morfina aumenta la expresión de Delta D en las regiones mencionadas, sobre todo en el rombencéfalo (Fig. 45B). En la misma línea, considerando que la morfina activa a los receptores opioides, concretamente al receptor opioide mu, se puede apreciar en la imagen C que la ausencia de este receptor induce la desaparición del ligando de Notch, Delta D, en prácticamente todo el mesencéfalo, aunque mantiene su expresión en el rombencéfalo. El silenciamiento o *knockdown* de los receptores opioides tipo delta ZfDOR1 (D) y ZfDOR2 (E), por separado o simultáneamente (F), disminuye la expresión de Delta D en determinadas áreas del mesencéfalo, fundamentalmente en el límite rostral con el diencéfalo. La distribución y la intensidad del marcaje de Delta D en el rombencéfalo es similar a la que se puede observar en los embriones del grupo control.

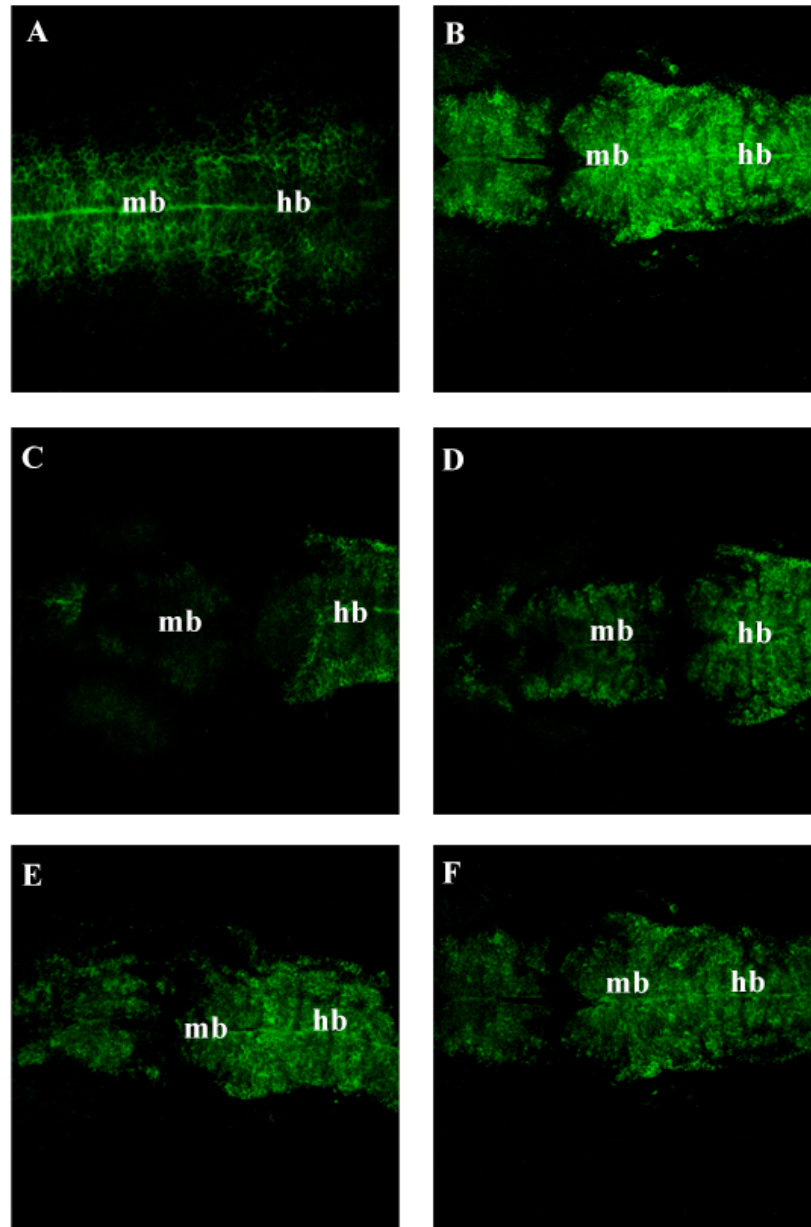


Figura 45. Expresión del ligando Delta D de Notch en embriones de pez cebra en el estadio de 24 hpf. A) control. B) embriones expuestos a morfina 10 nM. C) Embriones en los que se les ha silenciado ZfMOR. D) Embriones en los que se les ha silenciado ZfDOR1. E) Embriones en los que se les ha silenciado ZfDOR2. F) Embriones en los que se les han silenciado simultáneamente ZfDOR1 y ZfDOR2. mb: mesencéfalo; hb: rombencéfalo. Fotografías obtenidas con microscopio confocal Leica SP5.

Además de los ligandos delta A y D de Notch, hemos analizado el efecto que tiene tanto la activación del sistema opioide por la morfina, como el silenciamiento de los receptores mu, delta 1 y delta 2, en la expresión de uno de los genes diana de Notch,

Her 15. Este morfógeno presenta una distribución homogénea en mesencéfalo (mb) y rombencéfalo (hb) de los embriones control, es decir, no tratados y no inyectados (Fig. 46A). Simultáneamente hemos detectado tirosina-hidroxilasa, (TH) empleando técnicas inmunoquímicas, en los ganglios basales del rombencéfalo. La exposición de embriones a morfina 10 nM incrementa tanto la expresión de Her15, sobre todo en el mesencéfalo, como el número de neuronas dopaminérgicas (positivas a TH) en los ganglios basales (Fig. 46B). Por el contrario, el silenciamiento del receptor ZfMOR mediante la inyección de morfolino produce la pérdida casi total del mRNA de Her 15 en el mesencéfalo, y al mismo tiempo, desaparece la detección de TH (Fig. 46C). Por otro lado, el silenciamiento de los receptores opioides tipo delta del pez cebra, ZfDOR1 y ZfDOR2, no parece afectar de manera drástica a la expresión de Her 15, aunque se observa una disminución en el número de neuronas dopaminérgicas con respecto a los embriones del grupo control (Figs. 46 D y E). Sin embargo, el silenciamiento simultáneo de ambos duplicados delta induce la desaparición casi completa de neuronas dopaminérgicas en los ganglios basales, aunque la disminución de la expresión de Her 15 en mesencéfalo no resulta tan evidente como la detectada en embriones a los que se les ha silenciado el receptor opioide mu (Fig. 46F).

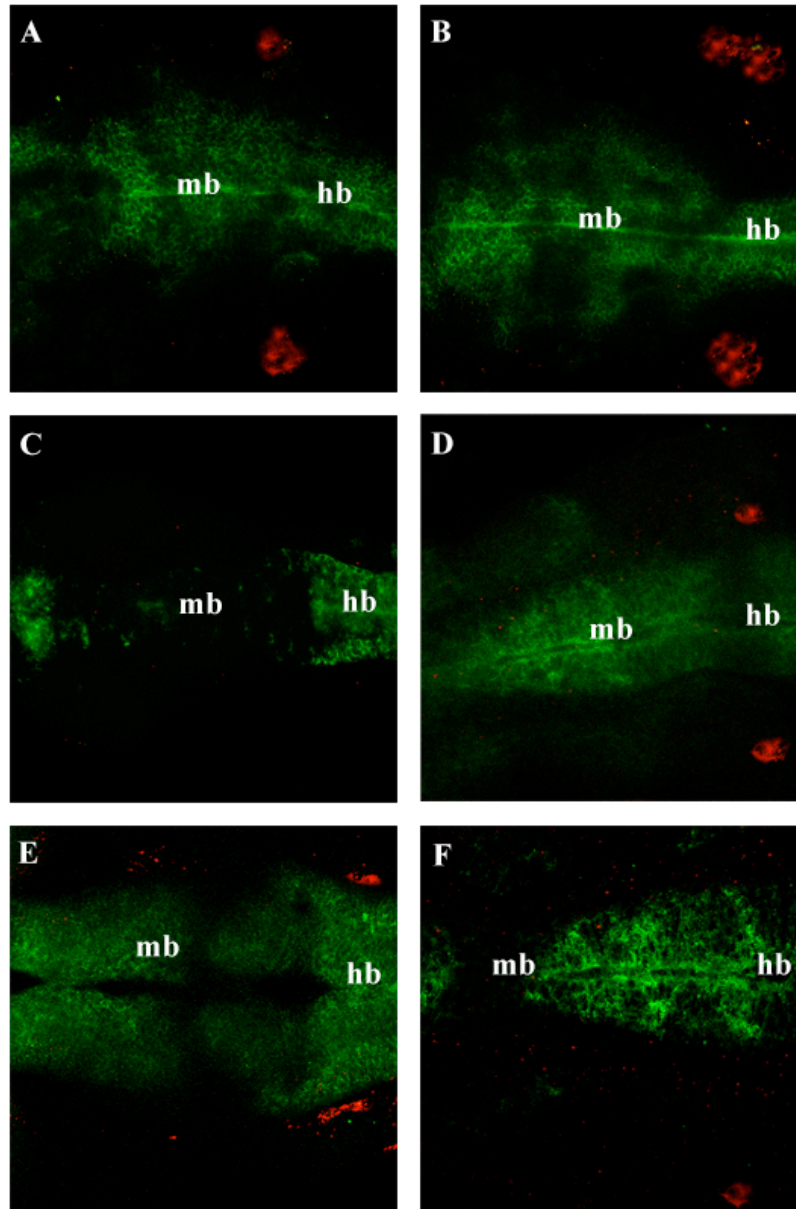


Figura 46. Expresión de Her15 (verde) y TH (rojo) en embriones de pez cebra de 24 hpf. A) Control. B) Embriones expuestos a morfina 10 nM. C) Embriones en los que se ha silenciado ZfMOR. D) Embriones en los que se ha silenciado ZfDOR1. E) Embriones en los que se ha silenciado ZfDOR2. F) Embriones en los que se han silenciado simultáneamente ZfDOR1 y ZfDOR2. mb: mesencéfalo; hb: rombencéfalo. Fotografías obtenidas con microscopio confocal Leica SP5.

V. DISCUSIÓN

Siguiendo la organización que planteamos en la sección de Resultados, hemos dividido la presente sección de Discusión en los siguientes apartados:

1. Expresión de los receptores opioides durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
2. Estudio de la expresión de ORL durante el desarrollo embrionario del pez cebra: influencia de la morfina y la nociceptina.
3. Influencia de la morfina en la expresión de los receptores opioides y en los cambios celulares y neuronales durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
4. Influencia de la morfina sobre la cascada de regulación del miR-133b mediante la activación del receptor opioide mu.
5. Análisis de la actividad neuroprotectora de la morfina a través de la activación de los receptores opioides tipo delta y su relación con el miR-133b y sus genes diana.
6. Estudio de sistemas de señalización intracelular cuya transcripción puede ser regulada por el sistema opioide.

V. 1. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES OPIOIDES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA

El sistema opioide endógeno ha sido estudiado durante el desarrollo embrionario de mamíferos (Hauser et al., 1989; Isayama et al., 1991; Kinney and White, 1991; Kivell et al., 2004; Mrkusich et al., 2004; Zhu et al., 1998), aunque nuestro estudio presenta por primera vez un análisis comparativo de la expresión tanto temporal como espacial (distribución) de los receptores opioides clásicos, mu, delta 1, delta 2 y kappa utilizando el pez cebra como modelo experimental. De esta manera, nuestros resultados pueden contribuir a mejorar los conocimientos sobre los mecanismos de acción de estos receptores acoplados a proteínas G. En este estudio hemos cuantificado la expresión de los receptores opioides durante el desarrollo embrionario, desde las 0,5 hpf hasta las 72 hpf, momento de la eclosión del embrión. Además hemos analizado la expresión de los receptores mu, delta 1, delta 2 en embriones de 24 hpf, fin de la subdivisión del SNC, y de 48 hpf, fin de la organogénesis y estadio en el cual está diferenciada la mayor parte de tipos neuronales.

Aunque en mamíferos no se detecta el mRNA de los receptores opioides mediante hibridación *in situ* hasta la segunda mitad del desarrollo embrionario (Zagon et al., 1990), en el pez cebra la expresión de estos receptores es detectada incluso antes de que los procesos de transcripción propios del embrión sean activos (antes de la transición midblástula, que tiene lugar a las 2,75 hpf y es el estadio en el cual los transcritos maternos comienzan a degradarse, proceso esencial para continuar el desarrollo embrionario). Nuestros resultados muestran cómo la expresión de los receptores opioides varía a lo largo del desarrollo embrionario (Fig. 19), presentado picos de expresión en diferentes estadios dependiendo del receptor opioide en estudio, lo que sugiere la existencia de diferentes funciones para cada uno de los receptores

opioides. Considerando el receptor opioide mu, su nivel de expresión génica durante la división e inicio de la diferenciación del Sistema Nervioso Central (16-24 hpf) es mayor que el de los otros receptores opioides, lo que sugiere que este receptor tiene una participación más relevante en estos procesos. Esta hipótesis está avalada por la investigación realizada por Kim y colaboradores, (2006), en la que demuestran *in vitro* que el receptor opioide mu está implicado en la diferenciación neuronal.

Por otra parte, los receptores opioides tipo delta del pez cebra, a pesar de compartir una elevada homología molecular (Barrallo et al., 1998a; Barrallo et al., 1998b; Kim et al., 2006; Pinal-Seoane et al., 2006), presentan una actividad farmacológica diferente, siendo los dos receptores activos (Gonzalez-Nunez et al., 2007b). Los resultados que incluimos como parte de esta Tesis Doctoral muestran que también a nivel de expresión génica durante el desarrollo embrionario ambos receptores tipo delta presentan diferencias, aunque ambos perfiles de expresión coinciden en un incremento en el número de copias de cada receptor tipo delta a las 22 hpf. Esto sugiere que cada duplicado delta podría tener una función distinta durante el desarrollo, ya que ZfDOR1 se expresa en mayor medida en los últimos estadios y ZfDOR2 se expresa fundamentalmente a las 22 hpf, estadio en el que sobrepasa el millón de copias por 25 ng de cDNA, que supone un incremento aproximado de diez veces sobre la media de expresión en los distintos estadios.

La presencia conjunta de los receptores opioides mu, delta 1 y delta 2 analizada mediante hibridación *in situ* (Figs. 20 y 21) pone de manifiesto una distribución abundante en el tubo neural de embriones de 24 hpf y una expresión más localizada a las 48 hpf. Además, los tres receptores opioides se detectan en las mismas regiones, posibilitando de esta manera la existencia de interacciones entre ellos, bien a nivel intracelular, o mediante la formación de dímeros. En numerosos estudios se ha puesto

de manifiesto la capacidad de dimerización de los receptores acoplados a proteínas G (Szidonya et al., 2008), esto es la formación de una única unidad funcional, modificando las características de cada receptor por separado. La existencia de expresión de varios receptores opioides en una misma región indica la posibilidad de existencia de dímeros en esas áreas, dato de especial relevancia para una mejor comprensión de la función del sistema opioide en el desarrollo del pez cebra. En los últimos años se han realizado diversos estudios que desvelan la posibilidad de que la dimerización de receptores opioides de lugar a los diferentes subtipos farmacológicos de estos receptores. Por otro lado, existe una gran controversia en torno a la posible existencia de dimerización de los receptores opioides, pues algunos autores afirman que estos receptores se expresan en regiones anatómicas diferentes y además ejercen funciones diferentes en relación con los mecanismos que modulan el dolor mecánico y térmico (Scherrer et al., 2009). Se ha observado que la heterodimerización genera receptores con nuevas características, habiéndose descrito como un proceso fisiológico que modifica la farmacología del receptor y regula su función. Se ha comprobado la existencia *in vitro* de dímeros delta-kappa y delta-mu (Chakrabarti et al.; Gomes et al., 2000; Jordan and Devi, 1999). En la actualidad, muchos esfuerzos en el campo de investigación de los opioides se dedican a la caracterización del dímero mu-delta (Rozenfeld and Devi, 2007), ya que se ha comprobado que la ausencia del receptor opioide delta mediante la técnica de *knockout* evita el desarrollo de tolerancia del receptor opioide mu por la morfina, lo que determinaría el mecanismo a través del cual la morfina, y por extensión otros agonistas opioides, dan lugar a los efectos adversos originados después de una administración prolongada de los mismos (Waldhoer et al., 2004). La posibilidad de estudiar la existencia de estos dímeros *in vivo*, utilizando el pez cebra como modelo, presenta a la comunidad científica una nueva herramienta en el

estudio de la adicción y podría contribuir al diseño de terapias contra la misma o al diseño de analgésicos opioides que no tuvieran la capacidad de producirla.

El receptor opioide kappa presenta un nivel de expresión génica muy bajo con respecto a los otros receptores opioides, y la expresión en el animal adulto es mayor que durante el desarrollo, por lo que se deduce que *in vivo* no parece estar tan implicado como los otros receptores opioides en el desarrollo embrionario, aunque *in vitro*, en cultivo primario neuronal, se ha comprobado su implicación en la diferenciación neuronal, junto con el receptor opioide mu (Kim et al., 2006).

V. 2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ORL DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA: INFLUENCIA DE LA MORFINA Y LA NOCICEPTINA

Estudios realizados en la última década apuntan a las posibilidad de que el sistema ORL endógeno sea un mecanismo regulador del sistema opioide, ejerciendo una actividad anti-opioide en el cerebro (Heinricher, 2003; Szidonya et al., 2008; Zeilhofer and Calo, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que la administración de un agonista de NOP vía medular produce analgesia (Ko et al., 2006; Stevens et al., 2009), lo que sugiere que este sistema actúa de manera diferente dependiendo de la región anatómica en la que se active. Además, el sistema NOP endógeno está implicado en procesos de diferenciación neuronal, lo que sugiere un papel en el desarrollo embrionario (Zaveri et al., 2006). A pesar del esfuerzo realizado para describir el complejo mecanismo bioquímico que se activa tras la unión de un agonista NOP a su receptor, aún se desconocen la mayor parte de los procesos implicados en este sistema. Los resultados de nuestro estudio permiten, como veremos más adelante, una mayor comprensión del comportamiento del sistema ORL/NOP a través del análisis de la expresión de este receptor durante el desarrollo embrionario.

En nuestro trabajo observamos que la cuantificación de ZfORL a lo largo del desarrollo embrionario del pez cebra es variable, al igual que sucedía con los otros tres receptores opioides estudiados. Analizando los resultados obtenidos mediante qPCR observamos que la expresión de ZfORL es significativamente menor si la comparamos con la de los receptores ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2. Sin embargo, hemos detectado dos bruscos aumentos en la expresión de ZfORL en los estadios de 48 y 72 hpf (Fig. 22), que coincide con lo observado en los receptores ZfMOR y ZfDOR1. La expresión de ZfORL durante el período en el cual se desarrolla el Sistema Nervioso Central es

escasa si la comparamos con la de ZfMOR. Sin embargo, la distribución del receptor NOP en embriones de pez cebra de 24 y 48 hpf (Figs. 25A y 26A) coincide con la de los receptores opioides, hecho que abre las puertas a la posibilidad de interacción entre ellos, fundamentalmente con el receptor opioide mu, con el que se sugiere que interacciona *in vitro* (Lutfy et al., 2001; Wang et al., 2005). Según estos autores, la interacción mu-NOP aumenta el desarrollo de tolerancia del receptor opioide mu por la morfina, además de inducir cambios tanto en la afinidad de ambos receptores por sus ligandos como en sus respectivas cascadas intracelulares. Considerando la importancia que puede tener NOP en el control de los efectos adversos de la morfina, hemos expuesto embriones de pez cebra a este agonista opioide (Fig. 24), que induce un descenso en el nivel de expresión génica de NOP en los dos estadios estudiados, lo que se podría interpretar como un mecanismo inicial de protección frente al desarrollo de tolerancia, ya que la interacción NOP-mu facilita este desarrollo. Además, la disminución de la expresión de NOP originada tras la exposición a morfina podría significar la existencia de un mecanismo de protección también frente a otros efectos adversos de la morfina, como las malformaciones embrionarias (Behnke and Eyler, 1993; Fujinaga and Mazze, 1988). El antagonista naloxona inhibe el efecto de la morfina, apuntando a que el efecto que ejerce la morfina sobre la expresión de NOP tiene lugar a través de receptores opioides. Además de producir cambios en el nivel de expresión génica de NOP, la morfina altera la distribución de este receptor en el tubo neural de embriones de 48 hpf (Fig. 26C), aumentando su expresión en el telencéfalo, que sugiere una posible implicación de NOP en procesos de plasticidad neuronal relacionados con el desarrollo de adicción a través del sistema opioide. Con el objeto de profundizar en la actividad del sistema endógeno de ORL, también hemos expuesto embriones de pez cebra a nociceptina (Fig. 23), y así hemos podido determinar de qué

manera afecta a la expresión de ORL un aumento en la concentración de su ligando endógeno. Nuestros resultados demuestran que el exceso de nociceptina (hemos expuesto los embriones a nociceptina exógena, cuyo efecto se añade a la producida por el propio embrión) no produce cambios en la expresión de su receptor a las 24 hpf, mientras que reduce considerablemente dicha expresión a las 48 hpf, sugiriendo la existencia de un mecanismo de control a corto plazo (24 hpf), que desaparece cuando la exposición a la nociceptina se alarga en el tiempo (48 hpf). Los cambios en el nivel de expresión génica inducidos por la nociceptina son inhibidos por la nocistatina, un conocido antagonista del receptor NOP; a diferencia de la morfina, la nociceptina sí produce cambios en la distribución del receptor NOP tanto a las 24 como a las 48 hpf, sobre todo en telencéfalo (Figs. 25B y 26B), región anatómica en la que se encuentran las estructuras relacionadas con la memoria y el aprendizaje (Meis, 2003), procesos en los que NOP está implicado. Además, considerando que los receptores opioides se localizan también en el telencéfalo, es posible que el incremento en la expresión de NOP en esta región inducido por la exposición a nociceptina sea producto del control que ejerce NOP sobre la actividad del sistema opioide endógeno.

V. 3. INFLUENCIA DE LA MORFINA EN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES OPIOIDES Y EN LOS CAMBIOS CELULARES Y NEURONALES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA

Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión a lo largo del desarrollo embrionario del pez cebra nos han llevado a plantearnos cómo funciona la regulación de los receptores opioides. Para ello, hemos analizado la influencia de la morfina, que actúa sobre los receptores opioides de pez cebra, en procesos característicos del desarrollo, como la proliferación celular, la diferenciación neuronal, y la protección neuronal. Nuestros resultados demuestran que la morfina actúa como agente inductor de la proliferación durante el desarrollo embrionario, habiendo analizado los estadios de 24 y 48 hpf (Fig. 27). Además, incrementa el número de neuronas positivas a Pax-6 a las 24 hpf (Fig. 27C), que se puede interpretar como una inducción de diferenciación neuronal, aunque disminuye el número de neuronas Pax-2 positivas a las 48 hpf (Fig. 27D), lo que sugiere que la morfina actúa como inductor de neurodiferenciación en estadios tempranos del desarrollo, cuando el Sistema Nervioso Central es aún inmaduro. En nuestras manos la morfina también actúa como sustancia neuroprotectora, específicamente frente a la exposición a glutamato (Fig. 29). Los resultados que presentamos en esta Tesis Doctoral apuntan incluso a que estos efectos de la morfina, descritos en la sección de Resultados, pueden ser consecuencia de los cambios a nivel transcripcional que produce la morfina sobre los receptores opioides, fundamentalmente, ZfDOR1 y ZfDOR2 (Fig. 30). Es interesante observar que no modifica la expresión del receptor opioide μ , hecho que sugiere la existencia de un mecanismo que, al menos en los estados iniciales de la exposición a morfina (hasta las 24 hpf), impide cambios de expresión en el receptor al que se une con mayor afinidad,

con el fin de prevenir el desarrollo de tolerancia y otros efectos adversos. Estos resultados aportan conocimientos importantes que pueden contribuir a aclarar la controversia suscitada en torno a las distintas acciones de la morfina en el organismo. Un ejemplo de esta controversia es el hecho de que a pequeñas concentraciones (10^{-14} M), la morfina promueva el crecimiento de las neuronas y actúe como agente neurotrófico en neuronas corticales y sin embargo a dosis mayores (10^{-6} M) inhiba la regeneración axonal (Brailoiu et al., 2004; Sinatra y Ford, 1979). Ya que la naloxona inhibe estos efectos de la morfina, se considera que las acciones mencionadas tienen lugar a través de receptores opioides.

La capacidad de la morfina de inducir proliferación durante el desarrollo embrionario, así como su potencial para incrementar el número de motoneuronas podría explicar el mecanismo por el que se desarrolla la hipertonia y disfunciones motoras en niños expuestos a agentes opioides (Kayemba-Kay's y Laclede, 2003), ya que la hipertonia está producida por un incremento en el número de sinapsis neuromusculares. El aumento del número de motoneuronas aumenta la probabilidad de establecer sinapsis neuromusculares. Además, se ha demostrado que la morfina potencia la regeneración medular (Zeng et al., 2007), por lo que la implicación de la morfina en la diferenciación de motoneuronas apunta a un posible mecanismo por el cual este agonista ejerce el mencionado efecto, y a partir de su estudio y análisis, podría ser útil como terapia de regeneración medular.

Por otro lado, se ha demostrado previamente *in vitro* que la morfina induce protección neuronal frente a daño isquémico en células de Purkinje vía receptor opioide delta. Además, la activación *in vitro* del receptor opioide delta por agonistas específicos como DPDPE produce protección de astrocitos frente a daño excitotóxico. Nuestros resultados en este sentido demuestran que también *in vivo*, a las 24 hpf, la morfina actúa

como neuroprotector, lo que presenta una importante novedad, ya que muchas de las sombras que existen en torno a la actividad de la morfina son consecuencia de la ausencia de estudios *in vivo*. Además, el hecho de que la morfina, a las 24 hpf, aumente el nivel de expresión génica de ZfDOR1 y disminuya el de ZfDOR2 sugiere que la morfina está actuando a través de estos receptores (ambos son funcionales desde el punto de vista farmacológico; Gonzalez-Nunez et al., 2007b; Pinal-Seoane et al., 2006), y según sus necesidades, induce una sobreexpresión del receptor o reduce su nivel de transcripción. Sin embargo, al menos un receptor delta (ZfDOR1) presenta mayor número de copias, indicando que este tipo de receptor es importante en la actividad neuroprotectora de la morfina. A las 48 hpf, la morfina produce el efecto contrario, de manera que aumenta el nivel de expresión génica de ZfDOR2 y disminuye la de ZfDOR1. En relación con el hecho de que la morfina aumenta la diferenciación neuronal a las 24 hpf y la reduce a las 48 hpf, se puede establecer que ZfDOR1 incrementaría el número de neuronas diferenciadas, mientras que ZfDOR2 lo reduciría. Estas variaciones de actividad de los receptores opioides delta pueden ser explicadas por las diferencias encontradas en su afinidad por la morfina, siendo mayor la de ZfDOR1 ($K_i = 223$ nm) que la de ZfDOR2 ($K_i = 1427.67 \pm 302.44$ nm; Pinal-Seoane et al., 2006).

El receptor opioide kappa, junto con el receptor opioide mu potencia la proliferación y diferenciación neuronal (Kim et al., 2006), aunque su nivel de expresión génica durante el desarrollo es hasta 1000 veces menor que el del resto de receptores opioides (Sanchez-Simon and Rodriguez, 2008), lo que, como ya se ha mencionado anteriormente, sugiere que este receptor tiene un efecto más sutil y menos evidente en el desarrollo embrionario que el receptor opioide mu o los receptores opioides delta. Sin embargo, la morfina aumenta la expresión de ZfKOR tanto a las 24 como a las 48 hpf,

efecto inhibido por la naloxona, que indica que el efecto está mediado por receptores opioides. Considerando la escasa afinidad que muestra ZfKOR por la morfina ($K_i = 503$ nm; Alvarez et al., 2006), estos resultados apuntan a que ZfKOR podría dimerizar con otros receptores opioides *in vivo*, posibilidad ya mencionada en otros trabajos (Yamada et al., 2006). Además, el receptor opioide kappa incrementa la analgesia opioide a nivel medular, donde se cree que dimeriza con el receptor opioide delta, por lo que el aumento de la expresión de ZfKOR producido por la morfina podría explicar la capacidad analgésica de este receptor, y no tanto su papel durante el desarrollo embrionario.

Los resultados presentados en este apartado presentan por primera vez evidencia *in vivo* sobre la actividad de la morfina como modulador de proliferación, de diferenciación neuronal y de protección neuronal, así como la relación entre estas funciones y los cambios en los niveles de expresión génica de los receptores opioides inducidos producidos por la morfina. Asimismo justificamos la utilización de embriones de pez cebra como modelo experimental, ya que los procesos anteriormente mencionados tienen lugar en mayor medida durante el desarrollo, facilitando de este modo la experimentación *in vivo*.

V. 4. INFLUENCIA DE LA MORFINA SOBRE LA CASCADA DE REGULACIÓN DEL MIR-133b MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR OPIOIDE MU

A lo largo del desarrollo de este proyecto de investigación, hemos estudiado tanto la expresión de los receptores opioides como el efecto de su activación por la morfina durante el desarrollo embrionario. Estos resultados han abierto puertas a la determinación de actividades y funciones del sistema opioide a través de cuyo análisis en profundidad podremos avanzar en el conocimiento de los mecanismos que describen la modulación del dolor y la adicción producida por los opioides.

Como hemos mencionado anteriormente, uno de los mecanismos de regulación génica más importante y cuya investigación está actualmente en auge es el constituido por los micro RNAs (miRNAs). Se ha demostrado que la actividad opioide tiene influencia sobre la regulación de determinados miRNAs, como el miR-190 (Zheng et al., 2010), por lo que la implicación del sistema opioide en proliferación, diferenciación neuronal o protección neuronal puede estar determinada por una interacción entre este sistema y cascadas de regulación transcripcional activadas por miRNAs. Con el objeto de determinar posibles miRNAs diana del sistema opioide realizamos un array de miRNAs sobre RNAs extraídos de embriones control y expuestos a morfina. De todos los miRNAs cuya expresión era alterada por la morfina, consideramos que el miR-133b era un candidato idóneo para nuestro estudio, debido al control que ejerce sobre la diferenciación de neuronas dopaminérgicas a través de la regulación de la expresión del factor de transcripción Pitx3, que a su vez activa la transcripción de la tirosina-hidroxilasa, TH, y del transportador de dopamina, DAT (Kim et al., 2007). El sistema dopaminérgico forma parte del circuito del dolor, así como del circuito de recompensa, y es considerado un componente importante en el desarrollo de adicción (Flores et al.,

2004; Leggio et al., 2009), consecuencia de un incremento de dopamina en el espacio sináptico prolongado en el tiempo que produce tolerancia del sistema por la dopamina. Teniendo en cuenta los estudios de Gianoulakis (Gianoulakis, 2009) en los que afirma que la morfina induce aumento de secreción de dopamina en el espacio sináptico, hemos descubierto un posible mecanismo que explicaría este efecto de la morfina. En nuestras manos, la morfina reduce la expresión del miR-133b (Fig. 31) y simultáneamente, incrementa el número de copias de Pitx3 (el gen diana de miR-133b), de TH y de DAT, de manera que a la vez que demostramos que la morfina influye en la regulación de la cascada de miR-133b, nuestros resultados en este punto sugieren que al igual que en mamíferos, el miR-133b regula la transcripción de Pitx3, relación aún no establecida en pez cebra, y que apunta a que el funcionamiento de miR-133b está conservado en vertebrados. Sin embargo, a través de nuestros experimentos de qPCR hemos observado que la morfina, a una dosis de 10 nM, disminuye la expresión de TH, a pesar de aumentar el número de copias del factor de transcripción que activa su expresión, Pitx3, aunque a una concentración de 1 nM, la morfina ejerce sobre la expresión de TH el efecto esperado, la aumenta, junto con Pitx3 y DAT. Estos resultados pueden ser consecuencia del comportamiento bifásico ya descrito para la morfina (Brailoiu et al., 2004; Sinatra and Ford, 1979), y aunque las concentraciones empleadas en nuestro estudio no difieren tanto como en los estudios mencionados (10^{-14} M vs. 10^{-6} M), los efectos de la morfina tanto a una concentración de 10 nM como de 1 nM son inhibidos por la naloxona.

El aumento de la expresión génica de Pitx3 observado tras la inyección de su región 3'UTR (Fig. 32), considerada la región diana de miR-133b, corrobora que este miRNA es el responsable de la regulación transcripcional de Pitx3. El mecanismo por el cual la morfina regula la expresión de miR-133b y los genes incluidos en su cascada

tiene lugar a través del receptor opioide μ , que presenta mayor afinidad por la morfina que los otros receptores opioides. El silenciamiento de este receptor induce un aumento de la expresión del miR-133b (Fig. 33) y como consecuencia, una disminución de la expresión de su gen diana, Pitx3, de TH y de DAT. Además, la morfina, en ausencia del receptor opioide μ no tiene ningún efecto sobre la expresión de los genes mencionados, lo que demuestra que la reducción del número de copias de miR-133b producido por la morfina es consecuencia de la activación del receptor opioide μ .

La activación del receptor opioide μ por la morfina, a través de la unión de su extremo carboxilo terminal a la subunidad α de la proteína $G_{i/o}$ desencadena una compleja cascada de señalización intracelular, entre cuyos componentes destaca la quinasa ERK 1/2 (Zheng et al., 2008). La activación de esta ruta regula la transcripción de determinados genes implicados en proliferación (Persson et al., 2003) e incluso en el desarrollo de tolerancia a la morfina (Macey et al., 2009). Considerando estos hechos, consideramos que ERK 1/2 puede ser el agente intracelular que ejerza como mediador del efecto de la morfina a través del receptor opioide μ en la regulación de la transcripción de los genes implicados en la diferenciación dopaminérgica. De esta manera, mediante inhibición química de ERK 1/2, tanto con PD98059 como con U1026, los inhibidores de esta quinasa más empleados en investigación, demostramos que ERK 1/2 interviene en la regulación de la cascada de miR-133b por parte de la morfina, ya que la ausencia de su actividad produce el mismo efecto que la ausencia del receptor opioide μ , es decir, aumenta la expresión de miR-133b y disminuye la expresión tanto de Pitx3 como de TH y de DAT (Fig. 34). Al igual que en el caso del silenciamiento del receptor opioide μ , la exposición a morfina de embriones en los que ha sido inhibida la actividad de ERK 1/2 no produce ninguna modulación del cambio en la expresión de miR-133b, Pitx3, TH y DAT inducido por la inhibición de

ERK 1/2. Por ello concluimos que en efecto, esta quinasa está implicada en la cascada intracelular que regula la transcripción de los genes que determinan la diferenciación dopaminérgica (ver esquema representado en la figura 47).

Nuestro estudio ha sido realizado utilizando el pez cebra como modelo experimental, y a pesar de que el sistema de regulación de miR-133b parece estar conservado y su actividad es similar a la estudiada en mamíferos, hemos creído conveniente comprobar el efecto que tiene la morfina sobre la expresión de miR-133b en un modelo mamífero, en este caso, neuronas de hipocampo de rata neonatal. Como describimos en la sección de Resultados, la morfina disminuye el nivel de expresión de miR-133b sólo en neuronas inmaduras (Fig. 35), lo que indica que el sistema opioide podría regular la diferenciación de los precursores neuronales hacia el fenotipo dopaminérgico pero no está implicado en la regulación de la cascada de regulación de miR-133b en las neuronas dopaminérgicas maduras.

A través del análisis y discusión de estos resultados, y considerando la bibliografía disponible, hemos esclarecido un mecanismo que puede explicar la función de la morfina como analgésico, ya que el incremento inicial de dopamina activa los receptores DRD2 a través de los cuales la dopamina ejerce su acción anti-nociceptiva. Además, la activación de los receptores DRD1 en la sustancia gris periacueductal también atenúa la sensación dolorosa, en este caso a través de la activación de neuronas que forman parte de la vía de inhibición descendiente (Wood, 2008). La disminución de dopamina está relacionada con la aparición de estímulos dolorosos en pacientes de Parkinson, enfermedad que cursa con una pérdida de neuronas dopaminérgicas (Coffeen et al., 2008).

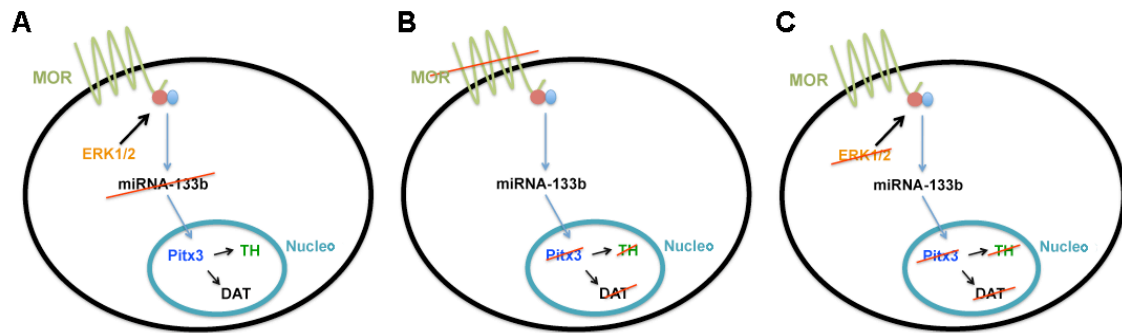


Figura 47. Esquema que describe el mecanismo por el que la morfina regula la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas a través del control de la expresión del miR-133b, y por tanto, de los genes cuya transcripción regula, como Pitx3, TH y DAT. A) La activación de la señalización ERK 1/2 por el receptor opioide mu reduce la expresión de miR-133b, y por tanto aumenta el nivel de transcripción de su gen diana, el factor de transcripción Pitx3, que induce un aumento en la expresión de TH y DAT, genes cuya transcripción es activada por Pitx3. B) El silenciamiento del receptor opioide mu produce un incremento en la expresión de miR-133b y por tanto, el nivel de transcripción de Pitx3, TH y DAT disminuye. C) La inhibición de ERK 1/2, incluso con la activación del receptor opioide mu por la morfina, produce el mismo efecto que el silenciamiento de este receptor, es decir, aumenta la expresión de miR-133b y por tanto reduce la expresión de Pitx3, TH y DAT, ocasionando una disminución de la tasa de diferenciación de las neuronas dopaminérgicas.

V. 5. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA DE LA MORFINA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES OPIOIDES TIPO DELTA Y SU RELACIÓN CON EL MIR-133b Y SUS GENES DIANA

Las neuronas dopaminérgicas son la fuente de dopamina más importante del organismo y por ello están implicadas directamente en la respuesta de recompensa asociada al consumo de drogas, sobre todo tras una administración prolongada, como consecuencia de la liberación de dopamina en el sistema mesolímbico del cerebro. El sistema opioide mantiene una estrecha relación con el sistema dopaminérgico ya que regula la interacción de numerosas drogas (opioides, cannabinoides, cocaína) con el organismo y es responsable tanto de la modulación del dolor como del desarrollo de tolerancia y dependencia a estas drogas, que en algunos casos extremos pueden originar adicción (Waldhoer et al., 2004). Aunque la comunidad científica ha relacionado el receptor opioide mu con la aparición de tolerancia a analgésicos opioides ampliamente utilizados en la clínica, como la morfina, recientemente se ha descubierto que la interacción entre los receptores opioides mu y delta induce tolerancia del receptor opioide mu por la morfina (Gendron et al., 2007), y por ello, es la responsable de los efectos adversos que produce el tratamiento crónico con este agonista opioide. A lo largo de esta Tesis Doctoral, hemos descrito una posible vía por la que la morfina podría producir analgesia y simultáneamente, tolerancia y dependencia: a través del miR-133b, que regula la diferenciación de neuronas dopaminérgicas. Considerando la interacción entre los sistemas opioide y dopaminérgico, ya descrita en el apartado anterior de esta sección, hemos estudiado la implicación de los receptores opioides tipo delta del pez cebra en la regulación de la diferenciación dopaminérgica y en la protección de estas neuronas. De esta manera hemos analizado un posible mecanismo

por el que el receptor opioide delta, al interactuar con el receptor opioide mu, puede producir tolerancia y dependencia. Además, estos resultados son válidos para establecer de qué manera el receptor opioide delta actúa como neuroprotector *in vivo*, función que hasta el momento sólo se ha establecido *in vitro* (Zhang et al., 2000; Narita et al., 2006).

La eliminación de uno de los duplicados delta del pez cebra aumenta la expresión del miR-133b y reduce el número de copias de su gen diana, Pitx3, así como de TH y de DAT (Figs. 36 y 37). Sin embargo, y a diferencia del efecto producido por el silenciamiento del receptor opioide mu, la morfina modifica los cambios observados en la expresión de los genes en estudio, aunque no los revierte, de manera que siempre la expresión de miR-133b es mayor en los embriones *knockdown* para los receptores opioides delta que en los embriones control, y la expresión de Pitx3, TH y DAT es menor en ausencia de estos receptores. Estos resultados apuntan a la existencia de un mecanismo de compensación entre los receptores opioides delta del pez cebra, por el que un receptor de alguna manera ejerce un efecto compensatorio sobre la función del otro cuando se silencia, que está en consonancia con lo descrito en las figuras 30C, 30D, 30E y 30F, en las que se observa cómo la morfina disminuye la expresión génica de un receptor opioide delta y simultáneamente incrementa la de su duplicado.

Sin embargo, después del silenciamiento conjunto de ambos receptores opioides delta, aunque el efecto producido sobre la expresión de miR-133b, Pitx3, TH y DAT es el mismo que produce el silenciamiento de uno de los dos receptores, la morfina no modifica los cambios en la expresión observados, de manera que el silenciamiento de ambos receptores opioides delta produce el mismo efecto que el silenciamiento del receptor opioide mu (Fig. 38). Esto sugiere que la presencia de estos receptores es también necesaria, junto con la del receptor opioide mu, en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas, y a su vez apunta a la posible existencia *in vivo* de

interacciones mu-delta durante el desarrollo embrionario, y que dichas interacciones, además de regular la aparición de tolerancia y dependencia a la morfina, estarían implicadas en la maduración del Sistema Nervioso Central (diferenciación neuronal).

Empleando técnicas inmunohistoquímicas, demostramos asimismo que los receptores opioides delta actúan como protectores de las neuronas dopaminérgicas frente al daño producido por la exposición a elevadas concentraciones de glutamato, un agente neurotóxico ampliamente utilizado en estudios de neuroprotección (Fig. 39) (Choi, 1988). Ambos duplicados comparten esta función, y en este caso, a diferencia de su implicación en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas, para su protección es necesaria la presencia de ambos receptores. De esta manera, cuando ambos receptores coexisten en el embrión, la morfina incrementa el número de neuronas dopaminérgicas, el glutamato reduce al máximo este número, y la exposición de morfina previa a la de glutamato inhibe el efecto del glutamato sobre las neuronas dopaminérgicas (Figs. 39 A-D). En ausencia de uno de los receptores opioides delta, aunque la morfina aumenta el número de neuronas dopaminérgicas, no es capaz de rescatar este tipo neuronal de la acción del glutamato (Figs. 39 E-L). El silenciamiento simultáneo de los receptores opioides delta evita que la morfina aumente el número de neuronas dopaminérgicas, a la vez que disminuye el número de estas neuronas en los animales control (Figs. 39 M-P). Al igual que en el caso del silenciamiento de un solo receptor, la morfina no inhibe el efecto del glutamato sobre las neuronas dopaminérgicas, lo que demuestra que en la regulación de la diferenciación de estas neuronas, aunque ambos receptores están implicados, la ausencia de uno de ellos puede ser compensada por el otro, mientras que en la protección de las neuronas dopaminérgicas son necesarios ambos receptores, ya que el silenciamiento de uno de ellos impide que la morfina ejerza su acción neuroprotectora frente al daño ocasionado por el glutamato.

A modo de resumen de esta sección podemos concluir que existen indicios importantes para afirmar que la morfina potencia la diferenciación neuronal a fenotipo dopaminérgico a través del receptor opioide mu y actúa como agente neuroprotector a través de los receptores opioides delta. Ambas acciones parecen tener un mecanismo común en el que está implicado el miR-133b, a través del cual se regula la diferenciación dopaminérgica, ya que inhibe la transcripción del factor Pitx3, y como consecuencia de los genes cuya expresión activa Pitx3, es decir TH y DAT, esenciales en la síntesis y metabolismo de la dopamina. Dada la escasa afinidad que los receptores opioides delta de pez cebra tienen por la morfina, nuestros resultados sugieren la existencia de una interacción entre ellos y el receptor opioide mu, y a través de esta interacción la morfina produce los efectos descritos en esta Tesis Doctoral. Considerando también que en el sistema dopaminérgico confluyen la modulación del dolor y el origen de la tolerancia y dependencia, nuestro estudio abre nuevas puertas al conocimiento de la actividad opioide que pueden ser importantes en la síntesis de nuevos analgésicos que conserven la potencia de la morfina, pero que eviten el desarrollo de sus efectos adversos.

V. 6. ESTUDIO DE SISTEMAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR CUYA TRANSCRIPCIÓN PUEDE SER REGULADA POR EL SISTEMA OPIOIDE

Durante los últimos años, a raíz de la clonación y caracterización de los receptores opioides, se ha intentado profundizar en los mecanismos que rigen la actividad del sistema opioide endógeno, tanto en su implicación en la modulación de la sensación dolorosa, como por su papel en el desarrollo de adicción a drogas no sólo de naturaleza opioide, sino también compuestos cannabinoides, nicotina, cocaína, etc. A lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral, se ha puesto de manifiesto el control que ejerce la morfina, a través del receptor μ , sobre la transcripción de genes relacionados con la diferenciación dopaminérgica, a través del miR-133b, que además, es un inhibidor de la proliferación (Hu et al., 2010). Al igual que regula esta ruta de señalización y a través de ella potencia la diferenciación de neuronas dopaminérgicas y las protege frente a daños excitotóxicos (glutamato), el sistema opioide podría ejercer sus funciones como inductor de proliferación o neurogénesis mediante la regulación de otras rutas de señalización, como Wnt1 y Notch, fundamentales durante el desarrollo embrionario, aunque también están presentes en el individuo adulto.

V. 6-1 Influencia del sistema opioide en la expresión de Wnt1

Wnt1 controla la subdivisión y diferenciación del Sistema Nervioso Central (*patterning*) a través de una serie de rutas de señalización que aún no están bien establecidas (Montcouquiol et al., 2006). Concretamente, regula la formación de los rombómeros y del mesencéfalo, aunque también controla la transcripción de otros genes de la familia *wingless* cuya actividad se centra en la formación de las regiones encefálicas rostrales (Ciani y Salinas, 2005). Además, Wnt1 está implicado, al igual que

los opioides, en neurogénesis (Amoyel et al., 2005) y más recientemente se ha descubierto que Wnt1 tiene cierta actividad en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas (Tang et al., 2010). Sin embargo, el interés suscitado por Wnt1 viene dado por su papel como inductor de proliferación de células tumorales, siendo responsable del desarrollo y metástasis de numerosos tumores (Coombs et al., 2008; Huang et al., 2008; Karim et al., 2009). Teniendo en consideración que como ya hemos demostrado, la morfina induce proliferación tanto *in vivo* como *in vitro* (Sargeant et al., 2008), nuestra hipótesis sobre el papel regulador de los opioides con respecto a la cascada de señalización de Wnt1 presenta una base más sólida.

Nuestros resultados demuestran que los perfiles de expresión de Wnt1 y el receptor opioide mu coinciden en el periodo del desarrollo embrionario en el que el Sistema Nervioso Central se está subdividiendo y diferenciando, el periodo de Segmentación. Con el objeto de establecer una posible relación de regulación entre el sistema opioide y Wnt1 hemos expuesto embriones de pez cebra a las 5 hpf a morfina, el agonista opioide por excelencia, MEGY, un agonista específico delta exclusivo del pez cebra, y SNC80, un agonista específico delta de mamífero con escasa afinidad por los receptores opioides delta del pez cebra (Pinal-Seoane et al., 2006). Nuestros resultados demuestran que antes del inicio de la subdivisión del Sistema Nervioso Central, a las 8 hpf, ningún opioide incrementa la expresión de Wnt1 (Fig. 41A), y por el contrario, cuando el cerebro se empieza a formar y a madurar, o la morfina (16 y 24 hpf) o MEGY (19 hpf) son capaces de aumentar el nivel de expresión génica de Wnt1 (Figs. 41 B-D). Estas diferencias en la actividad de los diferentes agonistas opioides, dependientes del estadio embrionario, apuntan a que cada receptor opioide tiene una función diferente, y que esta función tiene lugar en un momento concreto del desarrollo embrionario, como se ha mencionado en el primer capítulo de este trabajo. Es

interesante observar que en condiciones fisiológicas, en el momento en que Wnt1 presenta su máximo nivel de expresión génica durante el desarrollo (8 hpf), la expresión de los receptores opioides, concretamente del receptor opioide mu, disminuye, y por tanto, es lógico pensar que también disminuye la señalización opioide. Sin embargo, al administrar los agonistas opioides, el nivel de transcripción de Wnt1 se reduce en este estadio, lo que sugiere que la señalización procedente de la activación del sistema opioide debe disminuir para que Wnt1 se exprese al nivel adecuado a las 8 hpf.

En el inicio del proceso de subdivisión y diferenciación del Sistema Nervioso Central (16 hpf), la morfina incrementa el número de copias de Wnt1, y MEGY logra el mismo efecto a las 19 hpf, estadio en el que Wnt1 comienza a estar implicado directamente en neurogénesis (Amoyel et al., 2005). El silenciamiento de Wnt1 produce una disminución de neuronas diferenciadas hacia el final del periodo de Segmentación (24 hpf), estadio en el que tanto MEGY como la morfina incrementan la expresión de Wnt1. En este estadio, la morfina aumenta asimismo la expresión del receptor opioide delta 1 de pez cebra, ZfDOR1 (Sanchez-Simon et al., 2010), lo que podría estar relacionado por el incremento en el número de neuronas diferenciadas observado en embriones de pez cebra a las 24 hpf. En los últimos estadios del desarrollo embrionario analizados, 48 y 72 hpf, tanto la exposición a morfina como a MEGY aumenta la expresión de Wnt1 (Fig. 41 E-F), que en estos estadios se detecta a niveles muy inferiores comparado con periodos más tempranos del desarrollo embrionario del pez cebra, lo que corrobora el papel modulador que ejerce el sistema opioide sobre la expresión de Wnt1.

Además de los resultados obtenidos mediante PCR a tiempo real, mediante hibridación *in situ* hemos determinado que tanto MEGY como la morfina, a pesar de aumentar la expresión de Wnt1 a las 24 y 48 hpf, estadios en los que hemos detectado

un aumento de la intensidad del marcaje, no alteran la distribución de este morfógeno (Figs. 42 y 43). Sin embargo, el incremento de la expresión de Wnt1 inducido por los agonistas opioides mencionados no es homogéneo, siendo más evidente en la epífisis y en el techo óptico. El techo óptico es considerada una de las regiones en las que existe mayor nivel de proliferación (Nyholm et al., 2007), lo que se explica que la morfina incremente la expresión de Wnt1 en esta zona, ya que estudios previos demuestran la capacidad proliferativa de este agonista opioide. En la epífisis tiene lugar el inicio de la expresión del receptor dopaminérgico tipo 2, DRD2, (Boehmler et al., 2004) responsable junto con la tirosina-hidroxilasa y el transportador de la dopamina de la determinación del fenotipo neuronal dopaminérgico (Filippi et al., 2007). En este sentido, dada la implicación del receptor opioide mu, activado por la morfina, en la diferenciación dopaminérgica, es lógico que la morfina incremente la expresión de Wnt1 en las regiones en las que comienzan a madurar las primeras neuronas dopaminérgicas.

Los resultados obtenidos en la realización de esta Tesis Doctoral apuntan a que el equilibrio funcional entre la señalización opioide y la señalización Wnt1 es necesario para el desarrollo del Sistema Nervioso Central, lo que está en línea con los estudios previamente descritos en este trabajo de investigación. Además, este estudio proporciona información novedosa sobre mecanismos que puedan explicar la actividad opioide tanto en su función analgésica como en la adicción que induce su consumo durante un tiempo prolongado, ya que Wnt1 regula la plasticidad neuronal y podría determinar los cambios neuronales que tienen lugar tras la administración crónica de la morfina y otros agentes opioides.

V. 6-2 Implicación del sistema opioide en la señalización de Notch

La cascada de señalización de Notch es una de las rutas más importantes implicadas en la determinación de los distintos tipos celulares, de manera que se considera esencial en la diferenciación de numerosos tejidos, pero fundamentalmente del Sistema Nervioso Central, proceso conocido como inhibición lateral. En este sentido, Notch y el sistema opioide comparten su papel en el desarrollo del tubo neural, lo que hace plantearse la posible existencia de una relación entre ambos sistemas. A lo largo del proyecto de investigación descrito y discutido en esta Tesis Doctoral, hemos puesto de manifiesto la implicación del sistema opioide en el desarrollo embrionario, y hemos descubierto un mecanismo (regulación de la expresión de miR-133b) a través del cual este sistema produce analgesia y a la vez, adicción. La caracterización del mecanismo de regulación opioide de la diferenciación de neuronas dopaminérgicas abre puertas a la existencia de otros mecanismos de regulación transcripcional modulados por el sistema opioide que sean responsables de la actividad de este sistema tanto a nivel de analgesia como de adicción. Al igual que Wnt1, que se ha descrito en el apartado anterior, Notch parece un buen candidato para ser analizado como gen diana de la actividad opioide a nivel intracelular, ya que además de dirigir la determinación de diferentes tipos celulares, concretamente interviene en la especificación de las neuronas dopaminérgicas a través de sus ligandos delta, como se ha demostrado recientemente (Bauer et al., 2008). Además, la sobreexpresión del ligando de Notch delta 4 (Dll4) rescata el fenotipo dopaminérgico mediante la activación de precursores neurales que posteriormente se diferencian a neuronas dopaminérgicas (Androutsellis-Theotokis et al., 2009).

Teniendo en consideración estos hechos nuestros resultados resaltan la importancia de la actividad opioide, concretamente a través de la funcionalidad del

receptor opioide mu, en la expresión tanto de los ligandos de Notch, delta A y delta D, como en los genes cuya transcripción depende de la cascada de señalización que tiene lugar cuando Notch se une a uno de sus ligandos, como es el caso de Her15. Aunque esta parte de nuestro trabajo es preliminar, y por ello sólo hemos analizado la expresión de estos tres genes, nuestros resultados apuntan a que la activación del receptor opioide mu es necesaria para que se expresen los componentes de la ruta de señalización de Notch, y por tanto, para llevar a cabo su función. En concreto, la morfina incrementa la expresión de los ligandos de Notch DeltaA y DeltaD en el mesencéfalo (Figs. 44 y 45) y aunque no se detecta un aumento en la expresión de Her 15 mediante hibridación *in situ*, corroboramos en la figura 46 que la morfina potencia la diferenciación de neuronas dopaminérgicas, de manera que se aprecia un aumento del número de las mismas. En este estadio, 24 hpf, las neuronas dopaminérgicas se localizan en los ganglios basales, aunque su diferenciación parte del mesencéfalo, y a él migran en estadios posteriores del desarrollo para formar parte del circuito de recompensa. Es precisamente en esta región, el mesencéfalo o cerebro medio, donde el silenciamiento del receptor opioide mu tiene mayor repercusión en la expresión tanto de los ligandos de Notch como de Her 15, ya que como se observa en las figuras 44C, 45C y 46C, la ausencia de este receptor produce la pérdida casi total de los transcritos de estos tres genes y a la vez, desaparecen las neuronas dopaminérgicas, lo que corrobora el papel del receptor opioide mu en su diferenciación. La correlación entre la pérdida de expresión de DeltaA, DeltaD y Her15, es decir, de la actividad de Notch, la pérdida de neuronas dopaminérgicas y el silenciamiento del receptor opioide mu presenta una base firme para afirmar que el sistema opioide, además de controlar la diferenciación neuronal a través de la regulación de la expresión de miR-133b, lo hace a través de la regulación de la señalización Notch. En un futuro se pueden realizar los experimentos necesarios para

determinar una posible relación entre ambos mecanismos, como por ejemplo, que alguna molécula que forma parte de la cascada de Notch sea diana de la actividad del miR-133b.

Es interesante observar que el silenciamiento por separado de los receptores opioides delta ZfDOR1 y ZfDOR2, a pesar de alterar la intensidad de la expresión de DeltaA, DeltaD y Her 15, y de disminuir el número de neuronas dopaminérgicas, el efecto no es tan evidente como el observado en embriones *knockdown* para el receptor opioide mu (Figs. 44 D-E, 45 D-E y 46 D-E). Sin embargo, la ausencia simultánea de ambos receptores tipo delta produce un efecto similar a la ausencia del receptor opioide mu en la expresión de los genes relacionados con Notch y en la detección de las neuronas dopaminérgicas de los ganglios basales (Figs. 44F, 45F y 46F). Una situación similar se produce en relación a la regulación que ejercen los receptores opioides sobre la expresión del miR-133b, como ha sido descrito en el apartado correspondiente, es decir, la ausencia del receptor opioide mu produce un gran incremento en la expresión de miR-133b y por tanto, reduce radicalmente la expresión de los genes relacionados con la diferenciación dopaminérgica (Pitx3, TH, DAT). Cuando se silencian los receptores opioides delta por separado, el efecto es similar, pero la intensidad de este efecto es considerablemente menor, sugiriendo la existencia de un mecanismo compensatorio entre ambos receptores delta. Sin embargo, la ausencia simultánea de ZfDOR1 y ZfDOR2 produce el mismo efecto que el silenciamiento de ZfMOR.

Analizando estos resultados se puede deducir que aunque tanto el receptor opioide mu como los duplicados delta comparten funciones en el desarrollo del Sistema Nervioso Central, concretamente en su función de regulación de la cascada de señalización Notch, el receptor opioide mu está más directamente implicado, teniendo en cuenta además, que es el receptor que mayor afinidad tiene por la morfina. La

implicación del receptor opioide mu en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas a través de la regulación de dos mecanismos diferentes (Notch y miR-133b) muestra la importancia del sistema opioide en este proceso, que podría explicar tanto la actividad analgésica, dado el papel de la dopamina en la modulación de la sensación dolorosa, como la capacidad de producir adicción.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Expresión de los receptores opioides durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

- Los receptores opioides del pez cebra se expresan a lo largo de todo el desarrollo embrionario, aunque presentan diferentes perfiles de expresión.

- La expresión de los receptores opioides ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2 aumenta durante el desarrollo y diferenciación del Sistema Nervioso Central porque tienen funciones específicas en esta etapa de la embriogénesis.

2. Estudio de la expresión de ORL durante el desarrollo embrionario del pez cebra: influencia de la morfina y la nociceptina.

- Existe una interacción entre el sistema ORL/NOP y el sistema opioide clásico, a través del cual, la morfina ejerce un efecto sobre la expresión del receptor ORL.

- Los cambios en la distribución de ORL producidos por la nociceptina, fundamentalmente en el mesencéfalo, donde se encuentran los núcleos relacionados con la adicción, podrían estar implicados en la potenciación de la tolerancia por la morfina del receptor opioide mu producida por la interacción ORL-MOR.

3. Influencia de la morfina en la expresión de los receptores opioides y en los cambios celulares y neuronales durante el desarrollo embrionario del

pez cebra.

- *El sistema opioide, activado por la morfina, incrementa la tasa de proliferación celular, y ejerce un efecto neuroprotector sobre ciertos tipos neuronales in vivo.*
- *La morfina aumenta la tasa de diferenciación neuronal o la reduce en función del estadio embrionario, lo que corrobora que el sistema opioide tiene funciones diversas a lo largo del desarrollo.*
- *La morfina produce cambios en la expresión de los receptores opioides, fundamentalmente sobre ZfDOR1 y ZfDOR2, que pueden ser responsables de su implicación en los procesos mencionados anteriormente.*

4. Influencia de la morfina sobre la cascada de regulación del miR-133b mediante la activación del receptor opioide mu.

- *La cascada de regulación transcripcional del miR-133b está conservada en el pez cebra con respecto a los mamíferos.*
- *Hemos establecido un mecanismo in vivo por el que el receptor opioide mu potencia la diferenciación dopaminérgica mediante el control de la expresión de miR-133b y de su cascada de regulación transcripcional, mecanismo en el que está implicada la quinasa ERK 1/2.*
 - *El sistema opioide, a través de su activación por la morfina, sólo regula la expresión de miR-133b en neuronas inmaduras, por lo que es posible que este mecanismo sólo tenga lugar durante el desarrollo y no en el animal adulto.*

5. Análisis de la actividad neuroprotectora de la morfina a través de la activación de los receptores opioides tipo delta y su relación con el miR-133b y sus genes diana.

- La morfina ejerce su efecto neuroprotector in vivo mediante la activación de los receptores opioides tipo delta en las neuronas dopaminérgicas a través de la modulación del sistema regulador de miR-133b.

- La presencia de ambos receptores delta es necesaria para su actividad neuroprotectora, aunque la ausencia de uno es parcialmente compensada por el otro.

6. Estudio de sistemas de señalización intracelular cuya transcripción puede ser regulada por el sistema opioide.

- El sistema opioide está implicado en proliferación y neurogénesis mediante el control de la expresión, y por tanto, de la señalización, de Wnt1 y Notch.

- La interacción del sistema opioide con las cascadas de señalización de Notch está implicada en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas.

En resumen, nuestro trabajo profundiza en la actividad opioide del organismo, analizando su relación con el sistema dopaminérgico, fundamental tanto en la modulación de la sensación dolorosa como en el origen de la adicción. Nuestros resultados proporcionan nuevas herramientas de estudio para enfermedades como el

Parkinson, que cursan con pérdida de neuronas dopaminérgicas. Además, si al regular la diferenciación dopaminérgica, se regula la liberación de dopamina, y por tanto la analgesia endógena, los mecanismos descubiertos en esta Tesis Doctoral pueden servir de ayuda para la realización de nuevos estudios que tengan como finalidad la síntesis de compuestos que al regular la actividad del sistema dopaminérgico, tengan la potencia analgésica de la morfina, pero no produzcan tolerancia ni induzcan la aparición de procesos adictivos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez FA, Rodriguez-Martin I, Gonzalez-Nunez V, de Velasco EM, Gonzalez Sarmiento R and Rodriguez RE (2006) New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neurosci Lett* **405**(1-2):94-99.
- Amoyel M, Cheng YC, Jiang YJ and Wilkinson DG (2005) Wnt1 regulates neurogenesis and mediates lateral inhibition of boundary cell specification in the zebrafish hindbrain. *Development* **132**(4):775-785.
- Androutsellis-Theotokis A, Rueger MA, Park DM, Mkhikian H, Korb E, Poser SW, Walbridge S, Munasinghe J, Koretsky AP, Lonser RR and McKay RD (2009) Targeting neural precursors in the adult brain rescues injured dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(32):13570-13575.
- Anichtchik OV, Kaslin J, Peitsaro N, Scheinin M and Panula P (2004) Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem* **88**(2):443-453.
- Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Alvar F and Rodriguez RE (2000) ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res* **84**(1-2):1-6.
- Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Porteros A, Garcia-Isidoro M and Rodriguez RE (1998a) Cloning, molecular characterization, and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem Biophys Res Commun* **245**(2):544-548.
- Barrallo A, Malvar FG, Gonzalez R, Rodriguez RE and Traynor JR (1998b) Cloning and characterization of a delta opioid receptor from zebrafish. *Biochem Soc Trans* **26**(4):S360.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2):281-297.
- Bauer M, Szulc J, Meyer M, Jensen CH, Terki TA, Meixner A, Kinkl N, Gasser T, Aebischer P and Ueffing M (2008) Delta-like 1 participates in the specification of ventral midbrain progenitor derived dopaminergic neurons. *J Neurochem* **104**(4):1101-1115.
- Behnke M and Eyster FD (1993) The consequences of prenatal substance use for the developing fetus, newborn, and young child. *Int J Addict* **28**(13):1341-1391.
- Berrios I, Castro C and Kuffler DP (2008) Morphine: axon regeneration, neuroprotection, neurotoxicity, tolerance, and neuropathic pain. *P R Health Sci J* **27**(2):119-128.
- Bjorklund A and Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* **30**(5):194-202.
- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B and Levenson R (2004) Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn* **230**(3):481-493.

- Brailoiu E, Hoard J, Brailoiu GC, Chi M, Godbolde R and Dun NJ (2004) Ultra low concentrations of morphine increase neurite outgrowth in cultured rat spinal cord and cerebral cortical neurons. *Neurosci Lett* **365**(1):10-13.
- Brownstein MJ (1993) A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(12):5391-5393.
- Cau E and Blader P (2009) Notch activity in the nervous system: to switch or not switch? *Neural Dev* **4**:36.
- Cave JW and Baker H (2009) Dopamine systems in the forebrain. *Adv Exp Med Biol* **651**:15-35.
- Chakrabarti S, Liu NJ and Gintzler AR Formation of mu-/kappa-opioid receptor heterodimer is sex-dependent and mediates female-specific opioid analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(46):20115-20119.
- Chen Y, Mestek A, Liu J and Yu L (1993) Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J* **295** (Pt 3):625-628.
- Cheng P, Zhou J and Gabrilovich D (2010) Regulation of dendritic cell differentiation and function by Notch and Wnt pathways. *Immunol Rev* **234**(1):105-119.
- Chiou LC, Liao YY, Fan PC, Kuo PH, Wang CH, Riemer C and Prinssen EP (2007) Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Curr Drug Targets* **8**(1):117-135.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**(8):623-634.
- Ciani L and Salinas PC (2005) WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* **6**(5):351-362.
- Clark JA, Liu L, Price M, Hersh B, Edelson M and Pasternak GW (1989) Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype. *J Pharmacol Exp Ther* **251**(2):461-468.
- Coffeen U, Lopez-Avila A, Ortega-Legaspi JM, del Angel R, Lopez-Munoz FJ and Pellicer F (2008) Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat. *Eur J Pain* **12**(5):535-543.
- Coombs GS, Covey TM and Virshup DM (2008) Wnt signaling in development, disease and translational medicine. *Curr Drug Targets* **9**(7):513-531.
- Corbett AD, Henderson G, McKnight AT and Paterson SJ (2006) 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol* **147** Suppl 1:S153-162.
- Darland T and Dowling JE (2001) Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20):11691-11696.

- de Velasco EM, Law PY and Rodriguez RE (2009) Mu opioid receptor from the zebrafish exhibits functional characteristics as those of mammalian mu opioid receptor. *Zebrafish* **6**(3):259-268.
- Dlugos CA and Rabin RA Structural and functional effects of developmental exposure to ethanol on the zebrafish heart. *Alcohol Clin Exp Res* **34**(6):1013-1021.
- Dooley K and Zon LI (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* **10**(3):252-256.
- Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, Magendzo K and Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* **258**(5090):1952-1955.
- Fields HL, Heinricher MM and Mason P (1991) Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* **14**:219-245.
- Filippi A, Durr K, Ryu S, Willaredt M, Holzschuh J and Driever W (2007) Expression and function of nr4a2, lmx1b, and pitx3 in zebrafish dopaminergic and noradrenergic neuronal development. *BMC Dev Biol* **7**:135.
- Fishman MC (2001) Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science* **294**(5545):1290-1291.
- Flores JA, El Banoua F, Galan-Rodriguez B and Fernandez-Espejo E (2004) Opiate anti-nociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D1 (not D2) dopamine receptors. *Pain* **110**(1-2):205-214.
- Fujinaga M and Mazze RI (1988) Teratogenic and postnatal developmental studies of morphine in Sprague-Dawley rats. *Teratology* **38**(5):401-410.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M and Takeshima H (1993) Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta- and mu-subtypes. *FEBS Lett* **327**(3):311-314.
- Gendron L, Pintar JE and Chavkin C (2007) Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience* **150**(4):807-817.
- Gerlai R, Lahav M, Guo S and Rosenthal A (2000) Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* **67**(4):773-782.
- Gilbert SF (2005) *Developmental Biology*. Ed. Medica Panamericana, 7^aEd.
- Gianoulakis C (2009) Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse. *Curr Top Med Chem* **9**(11):999-1015.
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ and Schier AF (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**(5770):75-79.
- Goldsmith P (2004) Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol* **4**(5):504-512.

- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V and Devi LA (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* **20**(22):RC110.
- Gonzalez Nunez V, Gonzalez Sarmiento R and Rodriguez RE (2003) Characterization of zebrafish proenkephalin reveals novel opioid sequences. *Brain Res Mol Brain Res* **114**(1):31-39.
- Gonzalez-Nunez V, Arsequell G, Szemenyei E, Toth G, Valencia G and Rodriguez RE (2005) Binding profile of the endogenous novel heptapeptide Met-enkephalin-Gly-tyr in zebrafish and rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **314**(2):862-867.
- Gonzalez-Nunez V, Barrallo A, Traynor JR and Rodriguez RE (2006) Characterization of opioid-binding sites in zebrafish brain. *J Pharmacol Exp Ther* **316**(2):900-904.
- Gonzalez-Nunez V, Gonzalez-Sarmiento R and Rodriguez RE (2003a) Cloning and characterization of a full-length pronociceptin in zebrafish: evidence of the existence of two different nociceptin sequences in the same precursor. *Biochim Biophys Acta* **1629**(1-3):114-118.
- Gonzalez-Nunez V, Gonzalez-Sarmiento R and Rodriguez RE (2003b) Identification of two proopiomelanocortin genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res* **120**(1):1-8.
- Gonzalez-Nunez V, Marron Fernandez de Velasco E, Arsequell G, Valencia G and Rodriguez RE (2007a) Identification of dynorphin a from zebrafish: a comparative study with mammalian dynorphin A. *Neuroscience* **144**(2):675-684.
- Gonzalez-Nunez V and Rodriguez RE (2009) The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. *ILAR J* **50**(4):373-386.
- Gonzalez-Nunez V, Toth G and Rodriguez RE (2007b) Endogenous heptapeptide Met-enkephalin-Gly-Tyr binds differentially to duplicate delta opioid receptors from zebrafish. *Peptides* **28**(12):2340-2347.
- Guo S (2004) Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav* **3**(2):63-74.
- Hauser KF, McLaughlin PJ and Zagon IS (1987) Endogenous opioids regulate dendritic growth and spine formation in developing rat brain. *Brain Res* **416**(1):157-161.
- Hauser KF, McLaughlin PJ and Zagon IS (1989) Endogenous opioid systems and the regulation of dendritic growth and spine formation. *J Comp Neurol* **281**(1):13-22.
- Heinricher MM (2003) Orphanin FQ/nociceptin: from neural circuitry to behavior. *Life Sci* **73**(6):813-822.
- Herrero-Turrion MJ and Rodriguez RE (2008) Bioinformatic analysis of the origin, sequence and diversification of mu opioid receptors in vertebrates. *Mol Phylogenet Evol* **49**(3):877-892.

- Horne-Badovinac S, Lin D, Waldron S, Schwarz M, Mbamalu G, Pawson T, Jan Y, Stainier DY and Abdelilah-Seyfried S (2001) Positional cloning of heart and soul reveals multiple roles for PKC lambda in zebrafish organogenesis. *Curr Biol* **11**(19):1492-1502.
- Hu G, Chen D, Li X, Yang K, Wang H and Wu W (2010) miR-133b regulates the MET proto-oncogene and inhibits the growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* **10**(2):190-197.
- Huang CL, Liu D, Ishikawa S, Nakashima T, Nakashima N, Yokomise H, Kadota K and Ueno M (2008) Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* **44**(17):2680-2688.
- Isayama T, McLaughlin PJ and Zagon IS (1991) Endogenous opioids regulate cell proliferation in the retina of developing rat. *Brain Res* **544**(1):79-85.
- Jordan BA and Devi LA (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**(6737):697-700.
- Julius D and Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**(6852):203-210.
- Karim RZ, Gerega SK, Yang YH, Horvath L, Spillane A, Carmalt H, Scolyer RA and Lee CS (2009) Proteins from the Wnt pathway are involved in the pathogenesis and progression of mammary phyllodes tumours. *J Clin Pathol* **62**(11):1016-1020.
- Kayemba-Kay's S and Laclede JP (2003) Buprenorphine withdrawal syndrome in newborns: a report of 13 cases. *Addiction* **98**(11):1599-1604.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C and Hirth CG (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(24):12048-12052.
- Kim E, Clark AL, Kiss A, Hahn JW, Wesselschmidt R, Coscia CJ and Belcheva MM (2006) Mu- and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors. *J Biol Chem* **281**(44):33749-33760.
- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G and Abeliovich A (2007) A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* **317**(5842):1220-1224.
- Kinney HC and White WF (1991) Opioid receptors localize to the external granular cell layer of the developing human cerebellum. *Neuroscience* **45**(1):13-21.
- Kivell BM, Day DJ, McDonald FJ and Miller JH (2004) Developmental expression of mu and delta opioid receptors in the rat brainstem: evidence for a postnatal switch in mu isoform expression. *Brain Res Dev Brain Res* **148**(2):185-196.
- Ko MC, Wei H, Woods JH and Kennedy RT (2006) Effects of intrathecally administered nociceptin/orphanin FQ in monkeys: behavioral and mass spectrometric studies. *J Pharmacol Exp Ther* **318**(3):1257-1264.

- Kumar R, Balasenthil S, Manavathi B, Rayala SK and Pakala SB (2010) Metastasis-associated protein 1 and its short form variant stimulates Wnt1 transcription through promoting its derepression from Six3 corepressor. *Cancer Res* **70**(16):6649-6658.
- Lachowicz JE, Shen Y, Monsma FJ, Jr. and Sibley DR (1995) Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem* **64**(1):34-40.
- Leggio GM, Cathala A, Neny M, Rouge-Pont F, Drago F, Piazza PV and Spampinato U (2009) In vivo evidence that constitutive activity of serotonin_{2C} receptors in the medial prefrontal cortex participates in the control of dopamine release in the rat nucleus accumbens: differential effects of inverse agonist versus antagonist. *J Neurochem* **111**(2):614-623.
- Lutfy K, Hossain SM, Khaliq I and Maidment NT (2001) Orphanin FQ/nociceptin attenuates the development of morphine tolerance in rats. *Br J Pharmacol* **134**(3):529-534.
- Macey TA, Bobeck EN, Hegarty DM, Aicher SA, Ingram SL and Morgan MM (2009) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation counteracts morphine tolerance in the periaqueductal gray of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **331**(2):412-418.
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE and Gilbert PE (1976) The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* **197**(3):517-532.
- McMahon AP and Moon RT (1989) int-1--a proto-oncogene involved in cell signalling. *Development* **107 Suppl**:161-167.
- Meis S (2003) Nociceptin/orphanin FQ: actions within the brain. *Neuroscientist* **9**(2):158-168.
- Merims D and Giladi N (2008) Dopamine dysregulation syndrome, addiction and behavioral changes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **14**(4):273-280.
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B and et al. (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* **377**(6549):532-535.
- Mogil JS and Pasternak GW (2001) The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. *Pharmacol Rev* **53**(3):381-415.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G and Meunier JC (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* **341**(1):33-38.
- Montcouquiol M, Crenshaw EB, 3rd and Kelley MW (2006) Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu Rev Neurosci* **29**:363-386.

- Mrkusich EM, Kivell BM, Miller JH and Day DJ (2004) Abundant expression of mu and delta opioid receptor mRNA and protein in the cerebellum of the fetal, neonatal, and adult rat. *Brain Res Dev Brain Res* **148**(2):213-222.
- Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, Sato F, Wachi H, Seyama Y and Suzuki T (2006) Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J Neurochem* **97**(5):1494-1505.
- Nasevicius A and Ekker SC (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* **26**(2):216-220.
- Ninkovic J and Bally-Cuif L (2006) The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods* **39**(3):262-274.
- Nyholm MK, Wu SF, Dorsky RI and Grinblat Y (2007) The zebrafish *zic2a-zic5* gene pair acts downstream of canonical Wnt signaling to control cell proliferation in the developing tectum. *Development* **134**(4):735-746.
- Padilla PA and Roth MB (2001) Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13):7331-7335.
- Pasternak GW and Wood PJ (1986) Multiple mu opiate receptors. *Life Sci* **38**(21):1889-1898.
- Persson AI, Thorlin T, Bull C and Eriksson PS (2003) Opioid-induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors. *Mol Cell Neurosci* **23**(3):360-372.
- Pert CB, Pasternak G and Snyder SH (1973) Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science* **182**(119):1359-1361.
- Pichler FB, Laurenson S, Williams LC, Dodd A, Copp BR and Love DR (2003) Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nat Biotechnol* **21**(8):879-883.
- Pillai RS (2005) MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* **11**(12):1753-1761.
- Pinal-Seoane N, Martin IR, Gonzalez-Nunez V, de Velasco EM, Alvarez FA, Sarmiento RG and Rodriguez RE (2006) Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish. *J Mol Endocrinol* **37**(3):391-403.
- Reinscheid RK, Ardati A, Monsma FJ, Jr. and Civelli O (1996) Structure-activity relationship studies on the novel neuropeptide orphanin FQ. *J Biol Chem* **271**(24):14163-14168.
- Reinscheid RK, Higelin J, Henningsen RA, Monsma FJ, Jr. and Civelli O (1998) Structures that delineate orphanin FQ and dynorphin A pharmacological selectivities. *J Biol Chem* **273**(3):1490-1495.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ, Jr. and Civelli O (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* **270**(5237):792-794.

- Rivas-Boyer AA, Herrero-Turrion MJ, Gonzalez-Nunez V, Sanchez-Simon FM, Barreto-Valer K and Rodriguez RE (2011) Pharmacological characterization of a nociceptin receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Endocrinol*.
- Rodriguez RE, Barrallo A, Garcia-Malvar F, McFadyen IJ, Gonzalez-Sarmiento R and Traynor JR (2000) Characterization of ZFOR1, a putative delta-opioid receptor from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett* **288**(3):207-210.
- Rottbauer W, Baker K, Wo ZG, Mohideen MA, Cantiello HF and Fishman MC (2001) Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel alpha1 subunit. *Dev Cell* **1**(2):265-275.
- Rozenfeld R and Devi LA (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J* **21**(10):2455-2465.
- Sanchez-Simon FM and Rodriguez RE (2008) Developmental expression and distribution of opioid receptors in zebrafish. *Neuroscience* **151**(1):129-137.
- Sanchez-Simon FM, Arenzana FJ and Rodriguez RE (2010) In vivo effects of morphine on neuronal fate and opioid receptor expression in zebrafish embryos. *Eur J Neurosci* **32**(4):550-559.
- Sargeant TJ, Miller JH and Day DJ (2008) Opioidergic regulation of astroglial/neuronal proliferation: where are we now? *J Neurochem* **107**(4):883-897.
- Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL and Basbaum AI (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* **137**(6):1148-1159.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M and Greenberg ME (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* **439**(7074):283-289.
- Seger D (2010) Cocaine, metamfetamine, and MDMA abuse: the role and clinical importance of neuroadaptation. *Clin Toxicol (Phila)* **48**(7):695-708.
- Shin JT and Fishman MC (2002) From Zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**:311-340.
- Simon EJ, Hiller JM and Edelman I (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(7):1947-1949.
- Sinatra RS and Ford DH (1979) The effects of acute and chronic morphine treatment on the process of facial nerve regeneration. *Brain Res* **175**(2):315-325.
- Sneddon LU (2003) Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. *Brain Res* **972**(1-2):44-52.
- Sofuoglu M, Portoghese PS and Takemori AE (1991) Differential antagonism of delta opioid agonists by naltrindole and its benzofuran analog (NTB) in mice: evidence for delta opioid receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **257**(2):676-680.

- Stevens CW, Martin KK and Stahlheber BW (2009) Nociceptin produces antinociception after spinal administration in amphibians. *Pharmacol Biochem Behav* **91**(3):436-440.
- Stiene-Martin A, Gurwell JA and Hauser KF (1991) Morphine alters astrocyte growth in primary cultures of mouse glial cells: evidence for a direct effect of opiates on neural maturation. *Brain Res Dev Brain Res* **60**(1):1-7.
- Szidonya L, Cserzo M and Hunyady L (2008) Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions. *J Endocrinol* **196**(3):435-453.
- Tang M, Villaescusa JC, Luo SX, Guitarte C, Lei S, Miyamoto Y, Taketo MM, Arenas E and Huang EJ (2010) Interactions of Wnt/beta-catenin signaling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* **30**(27):9280-9291.
- Terenius L (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **32**(3):317-320.
- Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT and Zon LI (2004) The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* **20**(4):367-379.
- Waldhoer M, Bartlett SE and Whistler JL (2004) Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* **73**:953-990.
- Wang HL, Hsu CY, Huang PC, Kuo YL, Li AH, Yeh TH, Tso AS and Chen YL (2005) Heterodimerization of opioid receptor-like 1 and mu-opioid receptors impairs the potency of micro receptor agonist. *J Neurochem* **92**(6):1285-1294.
- Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE and Uhl GR (1993) mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21):10230-10234.
- Wang XM, Zhang KM and Mokha SS (1996) Nociceptin (orphanin FQ), an endogenous ligand for the QRL1 (opioid-receptor-like1) receptor; modulates responses of trigeminal neurons evoked by excitatory amino acids and somatosensory stimuli. *J Neurophysiol* **76**(5):3568-3572.
- Weber ML, Farooqui M, Nguyen J, Ansonoff M, Pintar JE, Hebbel RP and Gupta K (2008) Morphine induces mesangial cell proliferation and glomerulopathy via kappa-opioid receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**(6):F1388-1397.
- Wood PB (2008) Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Rev Neurother* **8**(5):781-797.
- Xu X, Meiler SE, Zhong TP, Mohideen M, Crossley DA, Burggren WW and Fishman MC (2002) Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. *Nat Genet* **30**(2):205-209.
- Xu XJ, Hao JX and Wiesenfeld-Hallin Z (1996) Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *Neuroreport* **7**(13):2092-2094.

- Yamada H, Shimoyama N, Sora I, Uhl GR, Fukuda Y, Moriya H and Shimoya
Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T and Bell GI (1993)
Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from
mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14):6736-6740.
- Zagon IS, Gibo DM and McLaughlin PJ (1990) Adult and developing human cerebella
exhibit different profiles of opioid binding sites. *Brain Res* **523**(1):62-68.
- Zaveri NT, Waleh N and Toll L (2006) Regulation of the prepronociceptin gene and its
effect on neuronal differentiation. *Gene* **384**:27-36.
- Zeilhofer HU and Calo G (2003) Nociceptin/orphanin FQ and its receptor--potential
targets for pain therapy? *J Pharmacol Exp Ther* **306**(2):423-429.
- Zeng YS, Nie JH, Zhang W, Chen SJ and Wu W (2007) Morphine acts via mu-opioid
receptors to enhance spinal regeneration and synaptic reconstruction of primary
afferent fibers injured by sciatic nerve crush. *Brain Res* **1130**(1):108-113.
- Zhang J, Haddad GG and Xia Y (2000) delta-, but not mu- and kappa-, opioid receptor
activation protects neocortical neurons from glutamate-induced excitotoxic
injury. *Brain Res* **885**(2):143-153.
- Zheng H, Loh HH and Law PY (2008) Beta-arrestin-dependent mu-opioid receptor-
activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) Translocate to Nucleus
in Contrast to G protein-dependent ERK activation. *Mol Pharmacol* **73**(1):178-
190.
- Zheng H, Zeng Y, Zhang X, Chu J, Loh HH and Law PY (2010) mu-Opioid receptor
agonists differentially regulate the expression of miR-190 and NeuroD. *Mol
Pharmacol* **77**(1):102-109.
- Zhu Y, Hsu MS and Pintar JE (1998) Developmental expression of the mu, kappa, and
delta opioid receptor mRNAs in mouse. *J Neurosci* **18**(7):2538-2549.

VIII. ANEXOS

**1. Sanchez-Simon FM and Rodriguez RE (2008)
Developmental expression and distribution of opioid receptors
in zebrafish. *Neuroscience* 151(1):129-137.**

DEVELOPMENTAL EXPRESSION AND DISTRIBUTION OF OPIOID RECEPTORS IN ZEBRAFISH

F. MACHO SANCHEZ-SIMON AND R. E. RODRIGUEZ*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Institute of Neuroscience of Castilla y León, University of Salamanca, Avenida Alfonso X El Sabio, s/n, 37007 Salamanca, Spain

Abstract—Zebrafish is a novel experimental model that has been used in developmental studies as well as in the study of pathological processes involved in human diseases. It has been demonstrated that the endogenous opioid system is involved in developmental mechanisms. We have studied the relationship between the different embryonic stages and opioid receptor expression for the four known opioid receptors in zebrafish (μ , δ 1, δ 2 and κ). The μ opioid receptor is detected at higher levels than the other opioid receptors before the midblastula transition and during the segmentation period. The δ duplicate 2 exhibits only one peak of expression at 21 h postfertilization (hpf), when the motor nervous system is forming. The κ receptor is expressed at very low levels. *In situ* hybridization studies at 24 hpf show that the opioid receptors are widely distributed in zebrafish CNS and at 48 hpf their localization is detected in more defined structures. Our results support specific implications of the opioid receptors in developmental processes such as morphogenesis of the CNS, neurogenesis, neuroprotection and development of neuromuscular and digestive system. Pain-related alterations can be a consequence of changes in the endogenous opioid system during development, hence we provide important information that might help to solve pain-related pathological situations. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: real time PCR, *in situ* hybridization, pain, addiction.

Zebrafish is a novel experimental model that has been extensively used in developmental studies (Goodrich, 2005; Amsterdam and Hopkins, 2006; Krens et al., 2006; Fisher and Howie, 2006). It shares with the fruit fly the effectiveness at genetic malleability and besides, as a vertebrate, it is related to humans. Recently, zebrafish is being used to acquire a deeper knowledge about the pathological mechanisms involved in certain diseases, as it has been shown that various human disorders can be reflected in a specific gene phenotype described in zebrafish (Amatruda and Zon, 1999; Fishman, 2001; Goldman et al., 2001; Trede et al., 2004; Tucker et al., 2006; Norrby, 2006; Ninkovic and Bally-Cuif, 2006; Aleström et al., 2006; Lieschke and Currie, 2007; Newman et al.,

2007). The capacity of the zebrafish to mimic a pathological process that affects humans has facilitated the discovery of the endogenous pathways implicated in the development of those processes. Both research fields, development and disease, are interconnected, as many alterations of physiological mechanisms found in adults are initiated during the process of embryogenesis, as a consequence of a mutation or exposure to an agent that interferes with the correct development of the embryo (Shin and Fishman, 2002). Zebrafish embryos also help to understand the pathways leading to certain disorders such as the formation of new vessels to irrigate tumors (Gridley, 2007).

The study of opioid receptors and their endogenous ligands has been a major target in the pain and drug addiction research fields. Morphine, one of the most potent analgesics known used to treat chronic pain, binds with high affinity to μ -opioid receptor. After a long term exposure to morphine, development of tolerance is observed. Interactions among the various opioid receptors could alter their pharmacological properties and intracellular trafficking (Rozenfeld and Devi, 2007), thus modifying the development of tolerance to respective agonists.

The endogenous opioid system has been implicated in developmental processes (Hauser et al., 1989; Zagon et al., 1990; Kinney and White, 1991; Isayama et al., 1991; Zhu et al., 1998; Ray and Wadhwa, 1999; Abeyta et al., 2002; Winzer-Serhan et al., 2003; Mrkusich et al., 2004; Kivell et al., 2004; Kim et al., 2006; Hou et al., 2006). Whether changes of this system during development would affect opioid activities in the adult remains to be demonstrated. The opioid system has been characterized in zebrafish (Barrallo et al., 1998a,b, 2000; Gonzalez-Núñez et al., 2003a,b,c, 2007; Alvarez et al., 2006; Pinal-Seoane et al., 2006). Molecularly, the zebrafish opioid receptors and the peptide precursors share high identity with those from human (Wang et al., 1994; Knapp et al., 1994; Simonin et al., 1995), mouse (Evans et al., 1992; Kaufman et al., 1995; Liu et al., 1995) or rat (Thompson et al., 1993; Meng et al., 1993; Abood et al., 1994). However, the pharmacological profiles of the opioid system present certain differences (Raynor et al., 1994; Rodriguez et al., 2000; Gonzalez-Núñez et al., 2006), suggesting functional differences in zebrafish as compared with mammals. It is possible that these differences can also affect the actions of opioid receptors during development, and interactions between the receptors could not only be involved in embryogenesis, but also in the development of the adult nociceptive system affecting the pain pathways. Taking such information into consideration, we investigated the expression of the μ , δ and κ opioid receptors in

*Corresponding author. Tel: +34-923294626; fax: +34-923294750.

E-mail address: requelmi@usal.es (R. E. Rodriguez).

Abbreviations: AP, alkaline-phosphatase; hpf, hours postfertilization; MAB, malic acid buffer; PBS, phosphate buffer saline; RT, room temperature; SSC, citrate buffer.

zebrafish embryos at different developmental stages from 0.5 hpf (hours postfertilization) to 72 hpf by quantitative PCR and *in situ* hybridization. These studies were carried out in order to determine the expression levels of these opioid receptors and their localizations within the embryo at various stages. The mechanism by which opioid receptors expression is regulated during development was investigated.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Zebrafish from the AB strain were used and maintained as previously described (Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002). Embryos were obtained by natural mating in mating cages and collected in Petri dishes with E3 medium. They were cultured at 28.5 °C in a Memmert incubator. The developmental stages of the embryos were determined by hpf. Animals were handled according to the guidelines of the European Community Council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), the current Spanish Legislation (BOE 67/8509–12, 1998) and with the Guide for Care and Use of Laboratory animals as adopted and promulgated by the U.S. National Institutes of Health. Every effort was made to minimize the number of zebrafish used and their suffering.

RNA extraction

Total RNA was extracted from the embryos in the following developmental stages: 0.5, 2.75, 3, 8, 16, 19, 22, 24, 30, 48, 60 and 72 hpf. The extraction was carried out using Trizol[®] Reagent (Invitrogen; Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) following the protocol recommended by the manufacturers.

cDNA synthesis

Total RNA (4 μ l) was reverse transcribed to cDNA using the Promega retrotranscription kit (Promega Biotech Iberica S.L., Alcobendas, Madrid, Spain). The RNA was combined with dT oligonucleotide in a total volume of 5 μ l and incubated at 70 °C for 5 min. The final volume of each reaction was brought up to 20 μ l by the addition of 4 μ l 5 \times reverse transcription buffer, 1 μ l nucleotides, 1 μ l retrotranscriptase, 3 μ l MgCl₂ and 5.5 μ l diethylpyrocarbonate-treated water. Samples were then incubated for 10 min at 25 °C, followed by 1 h at 42 °C and 15 min at 70 °C.

Quantitative real time PCR

cDNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm with a spectrophotometer (SmartSpec[™] Plus from BioRad). The quantification of the PCR products was accomplished with a standard curve using the SYBR-Green method. The SYBR-Green was included in a 2 \times Master Mix from Applied Biosystems (Alcobendas, Madrid, Spain) (SYBR Green dye, dNTPs, Passive Referente (ROX), AmpliTaq1 Gold DNA polymerase). The oligonucleotides used to amplify the different opioid receptors are summarized as follows: ZfMOR F: ACGAGCTGTGCA AGATTGTG; ZfMOR R: CCGATTGCAGATGAAAGGAT; ZfDOR1 F: ACTATGAGAG CGTGGACCGTT; ZfDOR1 R: GCGGAGGAGAGGATCCAGAT; ZfDOR2 F: TCAGG CAAA-CAATCTGCATG; ZfDOR2 R: CAGGATCATCAGGCCGTAGC; ZfKOR F: CATGTTACCAGTATCTTCACTTTGA; ZfKOR R: ACACTCTGTCGTGCCATTG TTC; β -actin F: ACACGACCCAGAGCATCAGGGAG; β -actin R: CCTCTCTTGCT CTGAGCCTCA. The final volume of each reaction was 20 μ l: 10 μ l of Master Mix, 0.8 μ l of each oligonucleotide, 7.4 μ l of distilled water and 1 μ l of cDNA in a concentration of 25 ng/ μ l. A standard curve was constructed for each experiment by serial dilutions of cDNA:

0.1 ng/ μ l, 0.01 ng/ μ l, 0.001 ng/ μ l and 0.0001 ng/ μ l. The amplification reaction took place in an ABI Prism 7300 detection system (Applied Biosystems), with the following conditions: 10 min at 95 °C followed by 36 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 55 °C. Three PCR reactions were performed for each sample per plate, and each experiment was repeated three times. We have used β -actin as an endogenous control.

Whole mount *in situ* hybridization

Twenty-four-hour and 48 hpf embryos were defrosted, rehydrated by rinsing in an increasing dilution of methanol/PBS and hand-dechorionated in phosphate buffer saline (PBS). The 24 and 48 hpf embryos were then treated with proteinase K (10 μ g/ml) for 20 min and 40 min respectively at room temperature (RT). The embryos were refixed with 4% paraformaldehyde/PBS, as well as several washes afterward with PBTw (PBS+0.1% Tween-20). Then the embryos were prehybridized for 2 h with the hybridization solution without probe. Then the digoxigenin-labeled oligo-probe was added (10 ng/ μ l) and hybridization was carried out overnight at 60 °C. The post-hybridization washes were carried out with 2 \times citrate buffer (SSC) and 0.2 \times SSC. Then the embryos were rinsed twice in malic acid buffer (MAB) and incubated for 3 h at RT with MAB+2% blocking agent from Boehringer Mannheim (Barcelona, Spain). This solution was replaced with anti-DIG-alkaline-phosphatase (AP) antibody (Roche Diagnostics, San Cugat del Vallés, Barcelona, Spain) diluted 1:6000 in MABI and the embryos were incubated with this mixture overnight at 4 °C. The incubation was followed by six washes, 15 min each, with MAB at RT. The embryos were then rinsed twice in 0.1 M Tris pH 9.5–1% Tween-20. The DIG-AP antibody bound was detected with BM purple substrate kept in the dark at RT without agitation. The images were captured with an Olympus microscope and analyzed using the software DP Controller.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.E.M. The mean of transcripts for each developmental stage was compared with the mean of transcripts at 3 hpf, when it is known that embryonic transcription begins (midblastula transition), using unpaired Student's *t*-test with Welch correction; $P\leq 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

When the expression profiles of the opioid receptors (μ , δ , κ) throughout zebrafish development were evaluated, we could demonstrate that the profiles of expression were different for each zebrafish opioid receptor. Expression was determined by absolute quantification using real time PCR. The expression of the zebrafish opioid receptors analyzed in this study with real time PCR could be detected at the very early stages of development (Fig. 1), as early as 30 min after fertilization. Since it is not until the stage of 2.75 hpf when the mRNA begins to be synthesized by the embryo itself (midblastula transition, Newport and Kirschner, 1982), the opioid receptor transcripts present in younger embryos were considered maternal. The fluctuations in the levels of opioid receptor transcripts could not be the result of overall instability of the mRNA because the β -actin expression profile exhibited a constant expression level throughout the zebrafish embryonic development (Fig. 1).

The expression of the zebrafish μ opioid receptor (Barrallo et al., 2000; ZfMOR, GenBank accession No.:

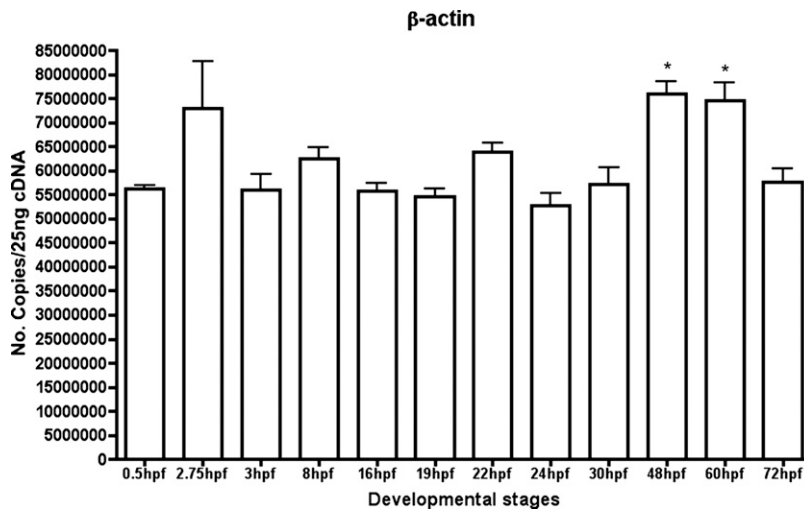


Fig. 1. Absolute quantification of the β -actin during zebrafish development. Three hundred embryos have been used from 0.5–16 hpf, 200 from 19 to 30 hpf and 150 from 48 to 72 hpf to extract the RNA used to synthesize the cDNA for all real time PCR reactions made in this research. Each bar represents the mean of mRNA copies of β -actin at each developmental stage \pm S.E.M. For each stage the number of experiments represented in this graph was between six and nine; * $P \leq 0.05$ (unpaired Student's t -test with Welch correction).

NM_131707) increases at the stage of 3 hpf (Fig. 2a), as a result of the accumulation of maternal and embryonic transcripts. The mRNA copies then decreased until the 16 hpf stage when mRNA expression increased progressively un-

til 22 hpf, within the segmentation period (10.75 hpf–24 hpf, Kimmel et al., 1995). Lower expression of zebrafish μ -opioid receptor was observed after 22 hpf until 48 hpf, when the highest peak of receptor expression was de-

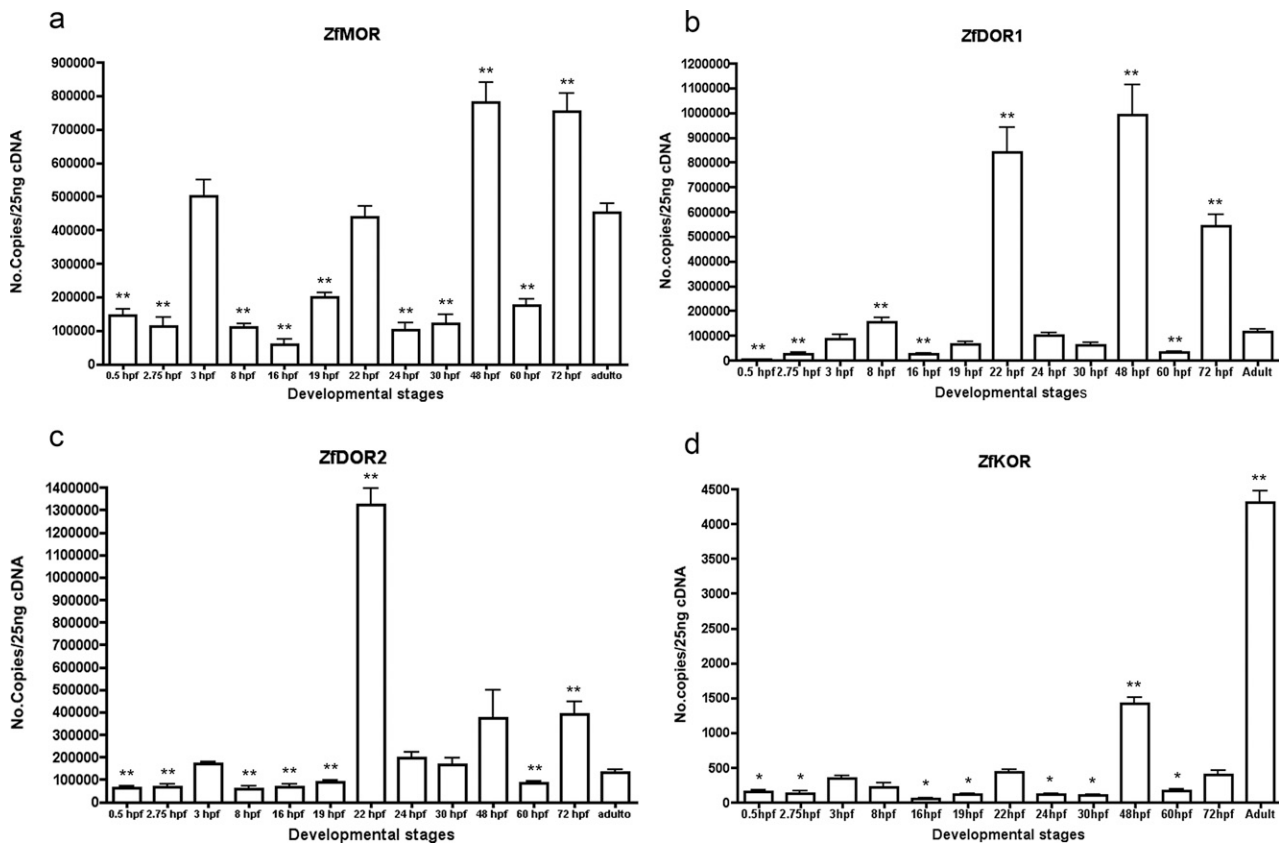


Fig. 2. Absolute quantification of the opioid receptors mRNA during zebrafish development. Each bar represents the number of mRNA copies of the studied receptor at each developmental stage \pm S.E.M. For each stage the number of experiments represented in this graph was between six and nine; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$ (unpaired Student's t -test with Welch correction).

tected, over 800,000 copies of receptor transcripts per 25 ng cDNA (Fig. 2a). This was a considerable increase (almost sevenfold) in comparison to the previous stages. The number of transcripts decreased at the stage of 60 hpf and increased again at the transition between the embryonic development and the larval development, i.e. at the stage of 72 hpf. The expression of the μ -opioid receptor in the zebrafish adult brain was lower (~451,000 copies per 25 ng cDNA) than the detected levels in certain developmental stages, e.g. the 48 or the 72 hpf.

In zebrafish two delta opioid receptors, considered to be duplicates, have been cloned, ZfDOR1 (Barrallo et al., 1998a,b; GenBank accession No.: NC_007130.2) and ZfDOR2 (Pinal-Seoane et al., 2006; GenBank accession No.: NM_212755). Although they share a higher homology between them and with the human delta opioid receptor than with the other opioid receptors, their pharmacological properties are quite different (Gonzalez-Nuñez et al., 2006). They have unequal affinities for various opioid agonists and antagonists. In Fig. 2b and c, the expression profiles of the two duplicates during the zebrafish embryogenesis were different, only having in common an expression peak at 22 hpf. However, the number of ZfDOR2 transcripts almost tripled the number of ZfDOR1 transcripts. The expression levels of ZfDOR1 decreased from a maximal expression level at 22 hpf until 48 hpf when 1,000,000 copies of transcript per 25 ng cDNA were observed. As seen in the μ -opioid receptor expression profile, the number of ZfDOR1 transcripts decreases at 60 hpf and increases toward the end of the embryonic developmental period, at 72 hpf. In contrast, the expression of ZfDOR2 reached its maximum at the 22 hpf stage and declined afterward without any increase in expression until the end of the period studied. When the expression of ZfDOR2 was analyzed in further detail around this partic-

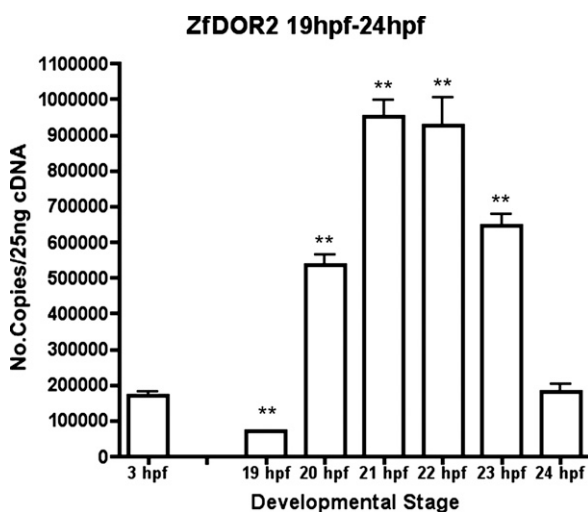


Fig. 3. Absolute quantification of the duplicate δ -opioid receptor ZfDOR2 between 19 hpf and 24 hpf. Each bar represents the number of mRNA copies of the studied receptor at each developmental stage \pm S.E.M. For each stage the number of experiments represented in this graph was between six and nine; ** $P \leq 0.005$ (unpaired Student's t -test with Welch correction).

ular stage, from 19 hpf to 24 hpf (Fig. 3), it could be shown that the expression began to increase at 20 hpf, it peaked at 21 hpf, was maintained until 22 hpf, and began to decrease through 23 hpf until 24 hpf. At 19 hpf, the embryo begins to have spontaneous tail movements but it is not until 21 hpf when this movement is associated with a reflex (Saint-Amant and Drapeau, 1998). Both delta duplicates are expressed at lower levels in the zebrafish adult brain than in the last stage of development, a feature shared by the μ -opioid receptor (Fig. 2b–c).

The zebrafish κ -opioid receptor, ZfKOR (Alvarez et al., 2006; GenBank accession No.: NM_182886), exhibited a different expression profile than the other three opioid receptors. The most dramatic difference was observed when the number of copies was compared (Fig. 2d). In contrast to the other three opioid receptors whose transcript numbers were determined to be between 100,000 and 1,000,000, the κ -opioid receptor transcript level was very low during the zebrafish development, reaching 1500 copies per 25 ng of cDNA at the highest level, detected in the stage of 48 hpf. The expression then decreased until the end of the embryogenesis, without any increase at the last stage as observed in the expression profile of the μ -opioid receptors and ZfDOR1. Also, in contrast to other opioid receptors, the number of κ -opioid receptor transcripts was higher in the zebrafish adult brain than during embryonic development (Fig. 2d).

Once the presence of opioid receptor transcripts throughout zebrafish development was established, in order to determine the possible roles that opioid receptors might play during vertebrate development, the spatial localization of these receptors within the embryo was examined. Thus, the spatial expression of the four opioid receptors was investigated (ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 and ZfKOR) at 24 and 48 hpf, using the *in situ* hybridization technique. ZfMOR mRNA was widely expressed in the CNS at 24 hpf. At this stage differential expression of ZfMOR was observed in telencephalon, epiphysis, diencephalon, midbrain, pretectum, isthmus, cerebellum and hindbrain (Fig. 4A–C). Such distribution was shared by ZfDOR2 (Fig. 5C), which was also present in myotomes and spinal cord. Myotomes are known to develop into the spinal muscles. When the ZfDOR2 spatial expression was examined between 19 and 24 hpf, the only expression peak of this receptor during development, this duplicate delta 2 from zebrafish was detected in the four encephalic subdivisions and in the tail muscle, the only muscle fully developed at these stages of embryonic development (Fig. 6). Although both delta duplicates share a high homology at a molecular level, their temporal and spatial expressions are different. The duplicate delta 1 was observed only in telencephalon, epiphysis, pretectum and cerebellum (Fig. 5B), colocalizing in these regions with ZfMOR and ZfDOR2. The expression of the κ -opioid receptor could not be detected with the *in situ* hybridization technique due to its relative low level of expression as determined by reverse transcription-PCR. In 48 hpf embryos the μ -opioid receptor was present in tegmentum, hypophysis, otic vesicle and pectoral flipper (Fig. 4D–F), a

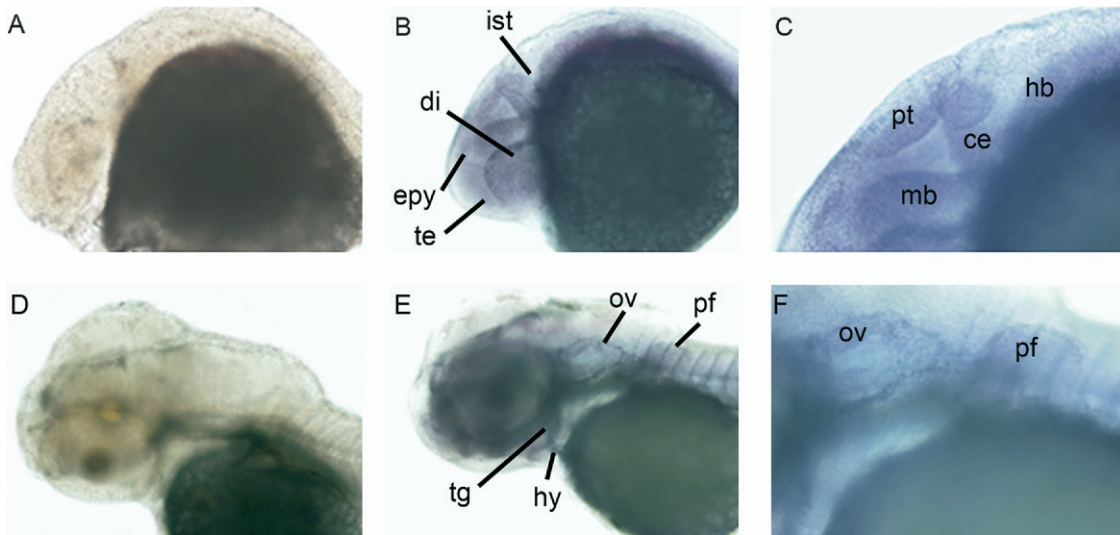


Fig. 4. Expression of the mu opioid receptor in zebrafish embryos. (A) Negative control at 24 hpf. (B) Expression of ZfMOR in telencephalon, epiphysis, diencephalon and isthmus in 24 hpf embryo. (C) Expression of ZfMOR in pretectum, midbrain, cerebellum and hindbrain in 24 hpf embryo. (D) Negative control at 48 hpf. (E) Expression of ZfMOR in tegmentum, hypophysis, otic vesicle and pectoral flipper in 48 hpf embryos. (F) Expression of ZfMOR in otic vesicle and pectoral flipper in 48 hpf embryo.

vital organ which is developing at this stage. In the tegmentum, an important group of nuclei involved in the transmission of nociceptive sensibility, ZfMOR was observed to coexpress with ZfDOR1 (Fig. 5E). ZfMOR and ZfDOR1 were also observed in the hypophysis, a major structure within the neuroendocrine system. However, ZfDOR1 was not expressed in the otic vesicle or the pectoral flipper, but instead it was detected in the ventral thalamus. The ZfDOR2 localization was not as defined as the other two opioid receptors (Fig. 5F). The expression of ZfDOR2 was

detected in telencephalon, diencephalon, midbrain and swim bladder, an important organ once the embryo has hatched to maintain its equilibrium in the water.

To determine if the differences in expression and subsequent functions of opioid receptors during development are due to changes in their nucleotide sequence, we analyzed the sequences from each opioid receptor cDNA isolated from those stages in which the expressions were increased. The analyses of the known sequences and the sequences from each developmental stage were carried

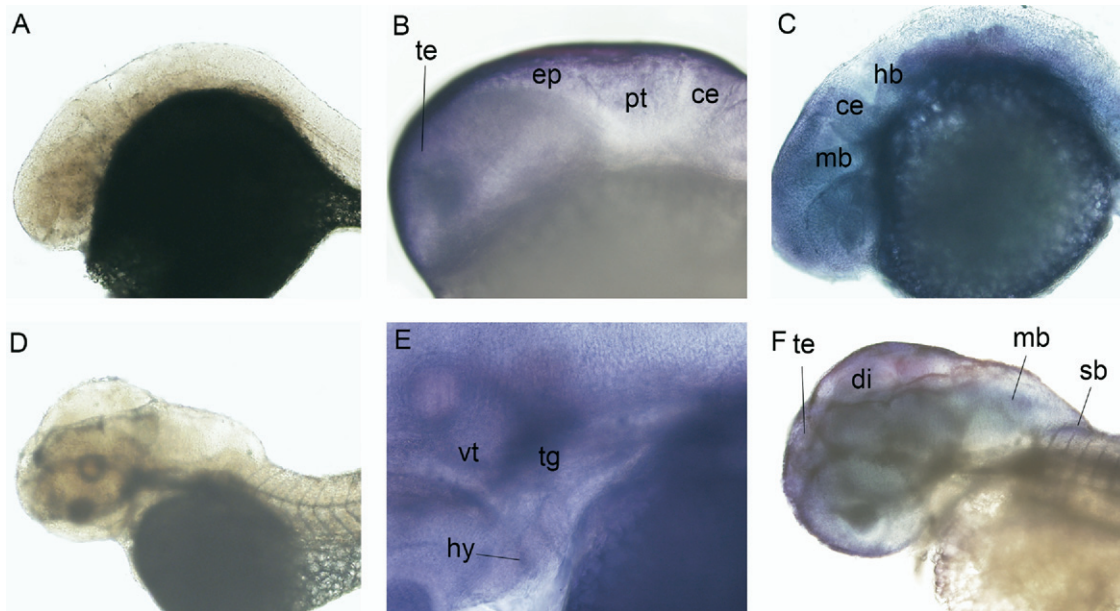


Fig. 5. Expression of the delta duplicates in zebrafish embryos. (A) Negative control at 24 hpf. (B) Expression of ZfDOR1 in telencephalon, epiphysis, pretectum and cerebellum in 24 hpf embryo. (C) Expression of ZfDOR2 in telencephalon, epiphysis, pretectum, diencephalon, midbrain and hindbrain in 24 hpf embryo. (D) Negative control at 48 hpf. (E) Expression of ZfDOR1 in hypophysis, ventral thalamus and tegmentum in 48 hpf embryo. (F) Expression of ZfDOR2 in telencephalon, diencephalon, midbrain and swim bladder in 48 hpf embryo.

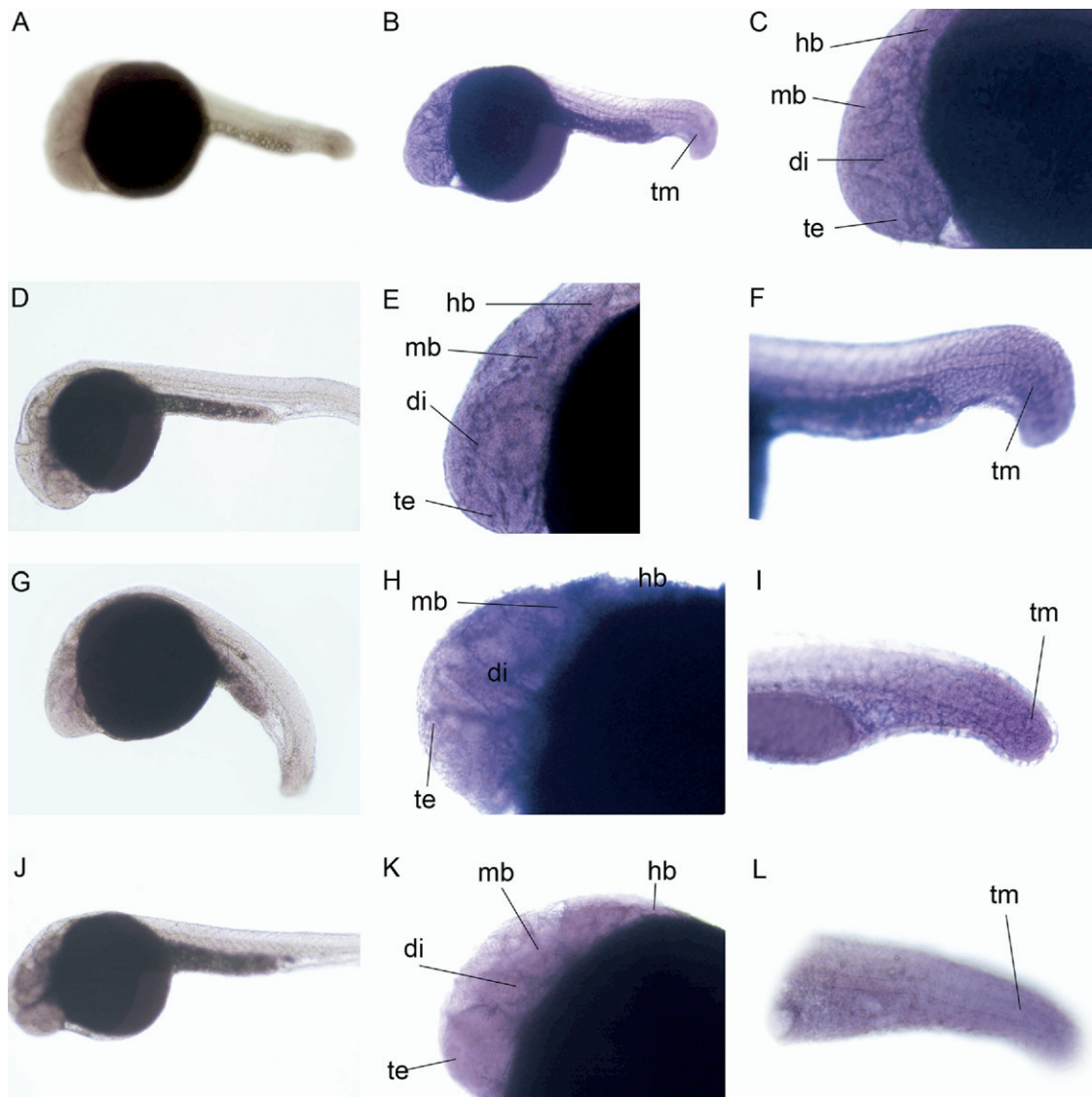


Fig. 6. (A) Negative control at 20 hpf. (B, C) Expression of ZfDOR2 in telencephalon, diencephalon, midbrain, hindbrain and tail muscle in 20 hpf embryo. (D) Negative control at 21 hpf. (E, F) Expression of ZfDOR2 in telencephalon, diencephalon, midbrain, hindbrain and tail muscle in 21 hpf embryo. (G) Negative control at 22 hpf. (H, I) Expression of ZfDOR2 in telencephalon, diencephalon, midbrain, hindbrain and tail muscle in 22 hpf embryo. (J) Negative control at 23 hpf. (K, L) Expression of ZfDOR2 in telencephalon, diencephalon, midbrain, hindbrain and tail muscle in 23 hpf embryo.

out with the comparison program Clustal W found on the EMBL web page. No change was observed in the embryonic sequences when compared with the adult sequence. Thus, the primary sequences of the opioid receptors should remain the same during the developmental period and in the adult.

DISCUSSION

The endogenous opioid system has been extensively studied during mammal development, suggesting a role in developmental processes (Hauser et al., 1989; Zagon et al., 1990; Kinney and White, 1991; Isayama et al., 1991; Zhu et al., 1998; Ray and Wadhwa, 1999; Abeyta et al., 2002; Winzer-Serhan et al., 2003; Mrkusich et al., 2004; Kivell et al., 2004; Kim et al., 2006). In this study we

present the first comparative analysis of the temporal and spatial expression of the mu, delta and kappa opioid receptors from zebrafish, which could provide new insights into the mechanisms of action of these GPCRs. The absolute expression of four opioid receptors (ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 and ZfKOR) was quantified during the complete embryogenesis of the zebrafish, from 0.5–72 hpf. Using the 24 and 48 hpf stages, the end of the segmentation period and the pharyngula period respectively (first and second third of zebrafish development), the presence of these opioid receptors could be demonstrated by *in situ* hybridization. Although in mammals, the opioid receptor mRNA was not detected by *in situ* hybridization until the second half of development (Rius et al., 1991; Zhu et al., 1998), the zebrafish opioid receptor transcripts could be

detected at the very early stages of development, even before the embryonic transcription mechanisms are known to be active (before 2.75 hpf, the stage in which the mid-blastula transition begins).

Our data show that the expression of the opioid receptors varies throughout the embryonic development. Peaks of expression were observed at different stages depending on the opioid receptor. These differences suggest that each opioid receptor could be involved in a specific process during development. For instance the μ -opioid receptor (ZfMOR) mRNA was detected at higher levels than the other opioid receptors during the segmentation period (Fig. 2a), when the CNS is beginning its subdivision and differentiation into the complex structure that is present in the adult animal. Hauser et al. (1989) have described the role of the endogenous opioid system in the morphogenesis of the mammal CNS. The hypothesis that the μ -opioid receptor is involved in neuronal differentiation, and therefore, influences the development of the CNS, is also supported by the results obtained by Kim et al. (2006), reporting that the μ -opioid receptor together with κ -opioid receptor could induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors *in vitro*.

The zebrafish duplicate delta opioid receptors, though sharing high identity (Barrallo et al., 1998a,b; Pinal-Seoane et al., 2006), were shown to have detectable differences at binding assays (Gonzalez-Nuñez et al., 2006). In this study, we demonstrated that both duplicates, though sharing a peak expression at 22 hpf, the end of the segmentation period, also exhibited different expression profiles, suggesting different roles during development (Fig. 2b, c). The expression levels of these two duplicate delta opioid receptors were relatively high, with the expression of ZfDOR2 reaching a million and a half copies per 25 ng of cDNA at 22 hpf, equivalent to ~2% of the β -actin transcript level (Fig. 1). A more detailed analysis of the expression level between 19 and 24 hpf showed that the peak was really at 21 hpf (Fig. 3), and was maintained during the following hour. By 17 hpf, embryos show spontaneous contractions of the trunk, but they acquire their highest frequency at 19 hpf. The embryo gains control over its own movements at 21 hpf, when it begins to have reflexes, such as moving its tail when its head is touched. During this period the motor neurons are beginning to differentiate (Chandrasekhar et al., 1997). The increase in the expression of ZfDOR2 at this particular stage, being the only peak in its expression during the whole embryonic development, suggests that ZfDOR2 might be involved in motor system development. DOR is known to affect glucose homeostasis in skeletal muscle, facilitating its glucose uptake (Evans et al., 2001). Since glucose is the major nutrient used by muscle cells to maintain their contractility and growth, the activation of the δ -opioid receptor would promote more efficient muscle activity. Our results also suggest a role for the δ -opioid receptor in skeletal muscle development, as we have shown that the expression was not only increased at the 21 hpf stage, but it was also localized in the tail muscle, the only muscle being formed at that stage (Fig. 6B, F, I, L). As the nervous reflexes and muscle move-

ments are interconnected, the influence of ZfDOR2 in both processes could affect the development of the neuromuscular system. Whereas ZfDOR2 may be involved in mechanisms occurring during at the end of the segmentation period (21–24 hpf), when its expression is greater, the other zebrafish delta opioid receptor, ZfDOR1, though sharing these functions, might have a more important role during the last stage of the development, between 48 and 72 hpf, where peaks of expression were also detected. In this period, the digestive system, where opioid receptor expression has been reported in adult animals, is being formed. An increase in expression can usually be the cause of an increased function, so it is possible that ZfDOR1, as well as ZfMOR is involved in the development of the digestive system, as they both present an increase in their expression at the stage of 48 hpf (Fig. 2a, b).

The kappa opioid receptor, ZfKOR, was expressed, but at a relatively low level, during zebrafish development (Fig. 2d). Since *in situ* hybridization studies could not be carried out, κ -opioid receptor influence in developmental processes could not be assessed and compared with the other opioid receptors.

Although all opioid receptors have been detected in adult zebrafish spinal cord (R. E. Rodriguez, unpublished observations), ZfDOR2 is the only receptor present in this organ during development, specifically at 24 hpf. The expression of opioid receptors in zebrafish embryos spinal cord is somewhat different from that observed in human embryos, where μ -opioid receptor is expressed (Ray and Wadhwa, 1999).

CONCLUSION

In conclusion, our results support the developmental roles played by the opioid receptors. The complete developmental study of the expression of the opioid receptors just after fertilization of the egg to the last stage of development suggests specific implications of the opioid receptors during vertebrate development, not only in morphogenesis of the CNS, neurogenesis and neuroprotection, but also in the development of the neuromuscular system and digestive system. Abnormalities regarding the transmission of the nociceptive signals or the existence of the endogenous analgesia can be a consequence of a change in the endogenous opioid system during development. Therefore, the study of the embryonic opioid system can provide important information on the appearance of these pathological processes and their possible solutions.

Acknowledgments—The Spanish Ministry of Education and Science (grant no. SAF2004-05144) and the Government of Castilla y León (grant no. SA0800A5) supported this research. The authors wish to thank Prof. Ping-Yee Law for his helpful advice and critical comments on the manuscript.

REFERENCES

- Abeyta A, Dettmer TS, Barnes A, Vega D, Carta M, Gallegos N, Raymond-Stintz M, Savage DD, Valenzuela CF, Saland LC (2002) Delta opioid receptor localization in the rat cerebellum. *Brain Res* 931:100–105.

- Abood ME, Noel MA, Farnsworth JS, Tao Q (1994) Molecular cloning and expression of a delta-opioid receptor from rat brain. *J Neurosci Res* 37:714–719.
- Aleström P, Holter JL, Nourizadeh-Lillabadi R (2006) Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends Biotechnol* 24:15–21.
- Alvarez FA, Rodriguez-Martin I, Gonzalez-Nuñez V, de Velasco EM, Gonzalez Sarmiento R, Rodriguez RE (2006) New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neurosci Lett* 405:94–99.
- Amatruda JF, Zon LI (1999) Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. *Dev Biol* 216:1–15.
- Amsterdam A, Hopkins N (2006) Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends Genet* 22:473–478.
- Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Alvar F, Rodriguez RE (2000) ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res* 84:1–6.
- Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Porteros A, Garcia-Isidoro M, Rodriguez RE (1998a) Cloning, molecular characterization, and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem Biophys Res Commun* 245:544–548.
- Barrallo A, Malvar FG, Gonzalez R, Rodriguez RE, Traynor JR (1998b) Cloning and characterization of a delta opioid receptor from zebrafish. *Biochem Soc Trans* 26:S360.
- Chandrasekhar A, Moens CB, Warren JT Jr, Kimmel CB, Kuwada JY (1997) Development of branchiomotor neurons in zebrafish. *Development* 124:2633–2644.
- Evans AA, Tunnicliffe G, Knights P, Bailey CJ, Smith ME (2001) Delta opioid receptors mediate glucose uptake in skeletal muscles of lean and obese-diabetic (ob/ob) mice. *Metabolism* 50:1402–1408.
- Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258:1952–1955.
- Fisher CE, Howie SE (2006) The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Dev Biol* 296:279–297.
- Fishman MC (2001) Zebrafish: the canonical vertebrate. *Science* 294:1290–1291.
- Goldman D, Hankin M, Li Z, Dai X, Ding J (2001) Transgenic zebrafish for studying nervous system development and regeneration. *Transgenic Res* 10:21–33.
- Gonzalez-Nuñez V, Marron Fernandez de Velasco E, Arsequell G, Valencia G, Rodriguez RE (2007) Identification of dynorphin A from zebrafish: a comparative study with mammalian dynorphin A. *Neuroscience* 144:675–684.
- Gonzalez-Nuñez V, Barrallo A, Traynor JR, Rodriguez RE (2006) Characterization of opioid-binding sites in zebrafish brain. *J Pharmacol Exp Ther* 316:900–904.
- Gonzalez-Nuñez V, Gonzalez-Sarmiento R, Rodriguez RE (2003a) Characterization of zebrafish proenkephalin reveals novel opioid sequences. *Mol Brain Res* 114:31–39.
- Gonzalez-Nuñez V, Gonzalez-Sarmiento R, Rodriguez RE (2003b) Cloning and characterization of a full-length pronociceptin in zebrafish: evidence of the existence of two different nociceptin sequences in the same precursor. *Biochem Biophys Acta* 1629:114–118.
- Gonzalez-Nuñez V, Gonzalez-Sarmiento R, Rodriguez RE (2003c) Identification of two proopioidmelanocortin genes in zebrafish *Danio rerio*. *Mol Brain Res* 120:1–8.
- Goodrich LV (2005) Hear, hear for the zebrafish. *Neuron* 45:3–5.
- Gridley T (2007) Vascular biology: vessel guidance. *Nature* 445:722–723.
- Hauser KF, McLaughlin PJ, Zagon IS (1989) Endogenous opioid systems and the regulation of dendritic growth and spine formation. *J Comp Neurol* 281:13–22.
- Hou Y, Belcheva MM, Clark AL, Zahm DS, Coscia CJ (2006) Increased opioid receptor binding and G protein coupling in the accumbens and ventral tegmental area of postnatal day 2 rats. *Neurosci Lett* 395:244–248.
- Isayama, T, McLaughlin PJ, Zagon IS (1991) Endogenous opioids regulate cell proliferation in the retina of developing rat. *Brain Res* 544:79–85.
- Kaufman DL, Keith DE Jr, Anton B, Tian J, Magendzo K, Newman D, Tran TH, Lee DS, Wen C, Xia YR, et al. (1995) Characterization of the murine mu opioid receptor gene. *J Biol Chem* 270:15877–15883.
- Kim E, Clark AL, Kiss A, Hahn JW, Wesselschmidt R, Coscia CJ, Belcheva MM (2006) Mu- and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors. *J Biol Chem* 281:33749–33760.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253–310.
- Kinney HC, White WF (1991) Opioid receptors localize to the external granular cell layer of the developing human cerebellum. *Neuroscience* 45:13–21.
- Kivell BM, Day DJ, McDonald FJ, Miller JH (2004) Developmental expression of mu and delta opioid receptors in the rat brainstem: evidence for a postnatal switch in micro isoform expression. *Brain Res Dev Brain Res* 148:185–196.
- Knapp RJ, Malatynska E, Fang L, Li X, Babin E, Nguyen M, Santoro G, Varga EV, Hruby VJ, Roeske WR, et al. (1994) Identification of a human delta opioid receptor: cloning and expression. *Life Sci* 54:463–469.
- Krens SF, Spaik HP, Snaar-Jagalska BE (2006) Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett* 580:4984–4990.
- Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8:353–367.
- Liu HC, Lu S, Augustin LB, Felsheim RF, Chen HC, Loh HH, Wei LN (1995) Cloning and promoter mapping of mouse kappa opioid receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 209:639–647.
- Meng F, Xie GX, Thompson RC, Mansour A, Goldstein A, Watson SJ, Akil H (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9954–9958.
- Mrkusich EM, Kivell BM, Miller JH, Day DJ (2004) Abundant expression of mu and delta opioid receptor mRNA and protein in the cerebellum of the fetal, neonatal, and adult rat. *Brain Res Dev Brain Res* 148:213–222.
- Newman M, Musgrave FI, Lardelli M (2007) Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochim Biophys Acta* 1772:285–297.
- Newport J, Kirschner M (1982) A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 30:675–686.
- Ninkovic J, Bally-Cuif L (2006) The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods* 39:262–274.
- Norrby K (2006) In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med* 10:588–612.
- Nüsslein-Volhard C, Dahm R (2002) Zebrafish 303 pp. New York: Oxford University Press.
- Pinal-Seoane N, Martin IR, Gonzalez-Nuñez V, de Velasco EM, Alvarez FA, Sarmiento RG, Rodriguez RE (2006) Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish. *J Mol Endocrinol* 37:391–403.
- Ray SB, Wadhwa S (1999) Mu opioid receptors in developing human spinal cord. *J Anat* 195:11–18.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45:330–334.
- Rius RA, Barg J, Bem WT, Coscia CJ, Loh YP (1991) The prenatal development profile of expression of opioid peptides and receptors in the mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 58:237–241.

- Rodriguez RE, Barrallo A, Garcia-Malvar F, McFadyen IJ, Gonzalez-Sarmiento R, Traynor JR (2000) Characterization of ZFOR1, a putative delta-opioid receptor from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett* 288:207–210.
- Rozenfeld R, Devi LA (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: β -arrestin2-mediated ERK activation by μ -opioid receptor heterodimers. *FASEB J* 21:2455–2465.
- Saint-Amant L, Drapeau P (1998) Time course of the development of motor behaviours in the Zebrafish embryo. *J Neurobiol* 37:622–632.
- Shin JT, Fishman M (2002) From zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:311–340.
- Simonin F, Gaveriaux-Ruff C, Befort K, Matthes H, Lannes B, Micheletti G, Mattei MG, Charron G, Bloch B, Kieffer B (1995) Kappa-opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7006–7010.
- Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron* 11:903–913.
- Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI (2004) The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* 20:367–379.
- Tucker B, Richards RI, Lardelli M (2006) Contribution of mGluR and Fmr1 functional pathways to neurite morphogenesis, craniofacial development and fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 15:3446–3458.
- Wang JB, Johnson PS, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Uhl GR (1994) Human mu opiate receptor cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett* 338:217–222.
- Winzer-Serhan UH, Chen Y, Leslie FM (2003) Expression of opioid peptides and receptors in striatum and substantia nigra during rat brain development. *J Chem Neuroanat* 26:17–36.
- Zagon IS, Gibo DM, McLaughlin PJ (1990) Adult and developing human cerebella exhibit different profiles of opioid binding sites. *Brain Res* 523:62–68.
- Zhu Y, Hsu MS, Pintar JE (1998) Developmental expression of the mu, kappa, and delta opioid receptor mRNAs in mouse. *J Neurosci* 18:2538–1849.

(Accepted 27 October 2007)
(Available online 4 November 2007)

2. Macho Sanchez-Simon F, Rodriguez RE (2009) Expression of the nociceptin receptor during zebrafish development: influence of morphine and nociceptin. *Int J Dev Neurosci.* 27(4):315-20.



Expression of the nociceptin receptor during zebrafish development: Influence of morphine and nociceptin

F. Macho Sanchez-Simon, R.E. Rodriguez *

University of Salamanca, Institute of Neuroscience of Castilla y León, Dept. Biochemistry and Molecular Biology, Laboratory of Neuroreceptors, Pain and Drug Addiction, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2008

Received in revised form 30 January 2009

Accepted 26 March 2009

Keywords:

Opioid receptor
Zebrafish
Development
Morphine
Nociceptin

ABSTRACT

The NOP system is considered to be part of the opioid system, although it exerts antiopioid actions depending on the anatomical region where it is localized. This apparent controversy has led to the hypothesis that the NOP system interacts with the classical opioid systems (μ , δ , κ) and regulates/modulates their activity in relation to analgesia and the development of addiction to drugs. In order to shed light into the importance of the NOP system, we have analyzed the expression of NOP during zebrafish development, and the effect of its endogenous agonist nociceptin and the opioid agonist morphine on NOP expression. Our qPCR study show that the number of NOP transcripts is different at each developmental stage studied (0.5 hpf, 2.75 hpf, 3 hpf, 8 hpf, 16 hpf, 19 hpf, 22 hpf, 24 hpf, 30 hpf, 48 hpf, 60 hpf and 72 hpf). Nociceptin enhances NOP expression at 24 hpf but decreases the number of NOP copies at 48 hpf, whereas NOP expression decreases after morphine exposure at 24 hpf and 48 hpf. Also, our ISH analysis demonstrates that nociceptin causes a change in the distribution of NOP towards rostral areas at both developmental stages. Morphine produces similar changes to those of nociceptin although only at 48 hpf. The present work leads to the conclusion that the NOP system is important during embryogenesis. Exposure to drugs changes the expression level and localization of NOP, suggesting that also during development, NOP plays a role in the apparition of dependence and addiction to drugs.

© 2009 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The N/OFQ receptor (NOP; originally known as ORL) is a member of the G-protein coupled receptor superfamily. NOP structure and localization are similar to what is observed of the classical opioid receptors, μ , δ and κ , although NOP activity is not affected by the opioid antagonist naloxone, used to discriminate opioid receptors (Lambert, 2008). In addition, NOP acts as an *antiopioid* system in supraspinal structures, although when it acts at a spinal level, the NOP system shares analgesic properties with the classical opioid receptors μ , δ and κ , which has constantly been a source of controversy in the opioid field. Since the discovery of its endogenous ligand, nociceptin (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995), the NOP receptor system has been considered an important target in medical research as a potential therapeutic tool in pain management and regulation of opioid-induced tolerance and dependence (Sakoori and Murphy, 2004, 2008), although the endogenous opioid system was already known to be involved in pain, addiction and other

processes such as memory (Gallagher and Kapp, 1978). As considered for opioid receptors, NOP develops tolerance to its endogenous or exogenous agonists when they are administered via spinal cord as antinociceptive agents. Furthermore, animals lacking NOP receptor showed a reduction in the development of tolerance to morphine, suggesting a crosstalk-tolerance between NOP agonists and morphine (Zaratin et al., 2004). It has been shown that there is an interaction between NOP and the μ opioid receptor, causing the impairment of μ opioid receptor agonists such as DAMGO (Wang et al., 2005). Also, the N/OFQ system is involved in the regulation of the effects of other drugs, such as cocaine (Marquez et al., 2008), which highlights the importance of NOP in addiction pathways. Concerning development, the endogenous NOP system has been implicated in neuronal differentiation (Zaveri et al., 2006), given the neurite outgrowth observed *in vitro* when neurons are treated with different agents that increase the expression of nociceptin mRNA. The implication of NOP in development is also shared by the classical opioid receptors, μ , δ and κ (Hauser et al., 1987; Zagon et al., 1989; Isayama et al., 1991; Narita et al., 2006; Kim et al., 2006).

Although many research studies have covered the bases of the NOP system activity and function, the exact mechanisms by which it exerts its action remain to be elucidated. The models used in previous studies have not been entirely successful in providing

* Corresponding author at: C/Pintor Fernando Gallego, 1, DC: 37007, Salamanca, Spain. Tel.: +34 923 294626; fax: +34 923 294750.

E-mail address: requelmi@usal.es (R.E. Rodriguez).

information on all the effects induced by the activation of NOP, which is essential to better understand the activity of the NOP system and its relationship with the opioid systems. As zebrafish is gaining importance in the study of numerous diseases, including degenerative diseases (Lieschke and Currie, 2007; Shin and Fishman, 2002; Fishman, 2001), it can be considered as a good model to study *in vivo* the functionality of the NOP system. The analysis of the implication of the NOP system in development will shed light into the mechanisms it activates and as a consequence, into its functionality and actions. Our results represent the first available data concerning the effects of morphine on ORL expression *in vivo*, as well as a complete expression study of NOP during embryogenesis.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

Zebrafish (AB strain) bred in our own facility were kept and raised according to standard protocols (Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002; Westerfield, 1995). Animals were handled according to the guidelines of the European Community Council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), the current Spanish Legislation (BOE 67/8509-12, 1998) and with the Guide for Care and Use of Laboratory animals as adopted and promulgated by the U.S. National Institute of Health.

2.2. Embryonic exposure to morphine and nociceptin

Zebrafish embryos were divided into six different groups and each group was exposed to a different ligand or combination of ligands: morphine, naloxone, naloxone/morphine, nociceptin, nocistatin and nocistatin/nociceptin. All ligands were administered to the embryos in their water environment, i.e., diluted in E3 embryonic medium. The exposure is continuous, in order to study the chronic effects of the exposure to drugs. Nociceptin and morphine (morphine sulphate; Spanish Institute of Health) were used in a concentration of 10 nM and exposure to each agonist begun at the stage of 5 hpf. The antagonists nocistatin and naloxone were used in a final concentration of 1 μ M and were diluted in embryonic medium 2 h before the agonists, that is, at the stage of 3 hpf in order to allow the antagonist to block the agonist's target. Expression of NOP in embryos from the six different experimental groups was analyzed at the stages of 24 hpf and 48 hpf. Both stages are essential in embryonic development, as the prim-5 stage (24 hpf) determines the end of the Segmentation Period, during which the CNS (Central Nervous System) is being formed and differentiated (Kimmel et al., 1995), and the long-pec stage (48 hpf) defines the end of the organogenesis. By means of HPLC-MS (Waters ZQ 4000 with an alliance HT HPLC apparatus), we have determined that 4% of the total concentration of morphine and 2% of the total concentration of nociceptin used is present in 24 hpf and 48 hpf embryos (data not shown). Control embryos at both stages are included in the complete expression analysis of ZfNOP during development, which were raised in drug-free E3 medium.

2.3. Quantitative real time PCR

Total RNA from whole embryos was extracted using Trizol[®] Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) following the protocol recommended by the manufacturers. cDNA synthesis was carried out by reverse transcription of total RNA to cDNA using the Promega Corporation (Madison, WI) reverse transcription KIT following the manufacturers protocol. The cDNA samples were then treated with RNase A (50 ng/ μ l) during 10 min at 65 °C in a water bath to avoid RNA contamination of the sample. As cDNA is a DNA–RNA double stranded hybrid, the RNase A does not act on these molecules. The RNase A was then precipitated using 8 μ l of 7.5 M ammonium acetate (30 min-incubation at 4 °C and spin at 13,000 rpm for 30 min at 4 °C). In order to eliminate the impurities of the sample as a consequence of these treatments, cDNA was precipitated with 0.5 ml cold absolute ethanol (30 min at –20 °C). The ethanol was discarded, and the cDNA pellet was eluted in DEPC-treated water.

The quantification of the PCR products was performed using SYBR-Green Power Master Mix (Applied Biosystems) as previously described (Macho Sanchez-Simon and Rodriguez, 2008). The amplification on β -actin on 25 ng of the cDNA used in all the experiments was established as control of cDNA quality. No significant differences were found in the expression of β -actin on the different cDNAs from both control and treated embryos. The oligonucleotides used to amplify the NOP receptor and β -actin were: ZfNOP F 5' CCGTCTGTACCCGGTGAA 3'; ZfNOP R 5' AAGATGCACTCGATGCT 3'; β -actin F 5' ACACGACCCAGCATCAGGGAG 3'; β -actin R 5' CCTCTTGCTCTGAGCCTCA 3'. The ABI Prism 7300 detection system (Applied Biosystems, Madrid, Spain) was used to amplify ZfNOP and β -actin, with the following conditions: 10 min at 95 °C followed by 36 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 55 °C. Three PCR reactions were performed for each sample per plate, and each experiment was repeated three times.

2.4. Standard curve

The absolute quantitation was achieved through a standard curve. A basic PCR was carried out to amplify the fragment of the transcript of interest (either ZfNOP or β -actin) on zebrafish cDNA with the same pair of primers that were going to be used in the real time PCR. The fragment was cut from the agarose gel and purified. Serial 1:10 dilutions were made from the purified PCR product, ranging from 100 ng/ μ l to 10^{–5} ng/ μ l. Four out of these eight points were chosen according to their Ct values, considering that the perfect amplification is obtained when the difference in the Ct values from one dilution to the next is 3.3, which gives a four-point straight line that has a slope of –3.3. The dilutions used in the standard curve of both genes, ZfNOP and β -actin, were: 0.1 ng/ μ l, 10^{–2} ng/ μ l, 10^{–3} ng/ μ l and 10^{–4} ng/ μ l. The number of copies was calculating by the following formula:

1. Number of bases of the amplicon (ZfNOP = 152; β -actin = 180) \times 330 Da/base \times 2 bases/basepair (the purified product is double-stranded DNA) = X g/mol (weight of the amplicon).
2. Weight of the amplicon/6.023 \times 10²³ = Y g/amplicon molecule.
3. Dilution concentration/Y g/amplicon molecule = Z molecules/ μ l.

2.5. Statistical analysis

The real time PCR results are expressed as mean \pm SEM. In the analysis of expression changes induced by drugs, the mean of transcripts for each treatment was compared with the mean of transcripts of the control group using unpaired Student's *t*-test with Welch correction; $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

2.6. Whole mount *in situ* hybridization

Embryos at 24 hpf and 48 hpf were dechorionated, fixed 20 min in 4% paraformaldehyde/PBS and maintained in absolute methanol at –20 °C until their use. Whole mount *in situ* hybridization was performed following previous protocols (Macho Sanchez-Simon and Rodriguez, 2008; Thisse et al., 1993). In brief, embryos were rehydrated, treated with proteinase K and refixed. After 2 h of prehybridization, they were left over night at 62 °C to hybridize. Washes with SSC were performed throughout 3 h, embryos were blocked also during 3 h and were incubated over night with the antidigoxigenin antibody conjugated with alkaline phosphatase (1:6000; Roche) at 4 °C. Embryos were then washed during 3 h and the hybridization was developed with an alkaline phosphatase substrate (Boehringer), a process that occurred in 10 min at RT.

3. Results

Given the importance of the endogenous NOP system and the need of more detailed information about its functionality, we have conducted a research on NOP during development, which is, at present, an unexplored field. We have first analyzed the expression of the zebrafish nociceptin receptor during zebrafish development. The expression profile of NOP was determined by real time PCR and our results demonstrate that the number of copies of ZfNOP (ZfORL, GenBank accession number: AY148348) varies throughout development. The fluctuations observed in the expression levels of ZfNOP are not the result of instability of the mRNA, as the β -actin expression profile, using the same samples, does not present significant changes during zebrafish development (Fig. 1A). NOP is first detected as maternal transcripts, in non-treated embryos, at the stage of one cell (Fig. 1B). The expression then increases during the following cell cleavages until the midblastula transition (3 hpf), when it reaches 2 \times 10⁵ copies per 25 ng of cDNA. The number of NOP transcripts is maintained at lower levels through Blastula and Gastrula periods (below 5 \times 10⁴ copies per 25 ng of cDNA), as well as most of the Segmentation Period. Although at 22 hpf we have detected an increase in the expression of NOP, it does not reach the level detected at 3 hpf, as can be observed in Fig. 1B. During the Pharyngula period (24–48 hpf), the number of copies of ZfNOP decreases once again, and right at the beginning of the Hatching Period (48 hpf), NOP experiences the highest increment of expression detected in the whole zebrafish embryonic development, over 8 \times 10⁵ copies per 25 ng of cDNA. The level of NOP transcription decreases at 60 hpf and increases again at the end of embryogenesis, 72 hpf.

We have also determined the changes in NOP expression produced in 24 hpf and 48 hpf zebrafish embryos when they are

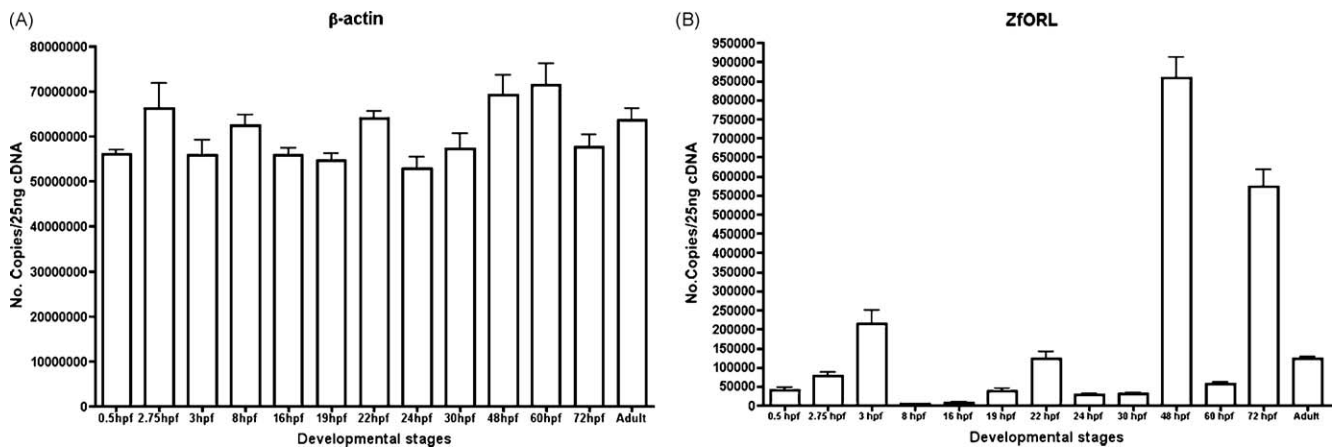


Fig. 1. (A) Absolute quantification of β -actin during zebrafish embryonic development (from 0.5 hpf/one cell stage to 72 hpf/protruding mouth) and adult. The expression is constant in all stages analyzed, as expected for a housekeeping gene. (B) Expression of NOP during zebrafish development. Three peaks of expression can be observed at 3 hpf, 48 hpf and 72 hpf. Each bar represents the mean of mRNA copies of the studied gene at each developmental stage \pm SEM.

exposed to the NOP receptor endogenous agonist, nociceptin, or to the opioid agonist morphine. In order to determine the influence of nociceptin, in the expression level of this receptor, 5 hpf zebrafish embryos were exposed to 10 nM nociceptin. At 24 hpf (Fig. 2A), the number of NOP transcripts does not present significant changes between control embryos and nociceptin-exposed embryos (27716 vs. 26108). However, the NOP antagonist nocistatin increases the expression of ZfNOP at 24 hpf. The concomitant exposure to nocistatin and nociceptin greatly enhances the transcription of NOP, reaching 8×10^5 number of NOP transcripts per 25 ng cDNA. At 48 hpf nociceptin radically decreases the transcription level of NOP (Fig. 2B), while the antagonist nocistatin does not produce, by itself, any relevant changes in the number of NOP transcripts. When both NOP ligands act together, nocistatin partially reverts the decrease in the number of NOP copies induced by nociceptin, although it does not return NOP expression to control level.

It is known that morphine, a widely used opioid agonist, does not show affinity towards the nociceptin receptor. However, morphine induces changes in the expression of many genes that

are not related to the opioid system, acting as a transcriptional modulator (Korostynski et al., 2007), and it also affects the expression of the nociceptin precursor (Takayama and Ueda, 2005). Hence, we have analyzed the possible alterations in NOP expression when zebrafish embryos are exposed to 10 nM morphine, and whether this effect is inhibited by the opioid antagonist naloxone. At the beginning of the Pharyngula Period (24 hpf), NOP is downregulated after separate exposure to morphine and naloxone (Fig. 3A), while when embryos are exposed first to naloxone and 2 h later to morphine, naloxone successfully inhibits the effect of morphine by enhancing NOP expression, which returns to control level (approx. 3.2×10^4 copies). In 48 hpf embryos, morphine decreases over 10-fold the expression of NOP, while naloxone does not affect this expression (Fig. 3B). Exposure to naloxone before morphine inhibits the morphine-induced downregulation of NOP, and therefore, no significant changes are observed in the number of NOP transcripts when compared to control embryos.

Our *in situ* hybridization studies show that at 24 hpf, NOP is present in the dorsal parts of most of the brain regions

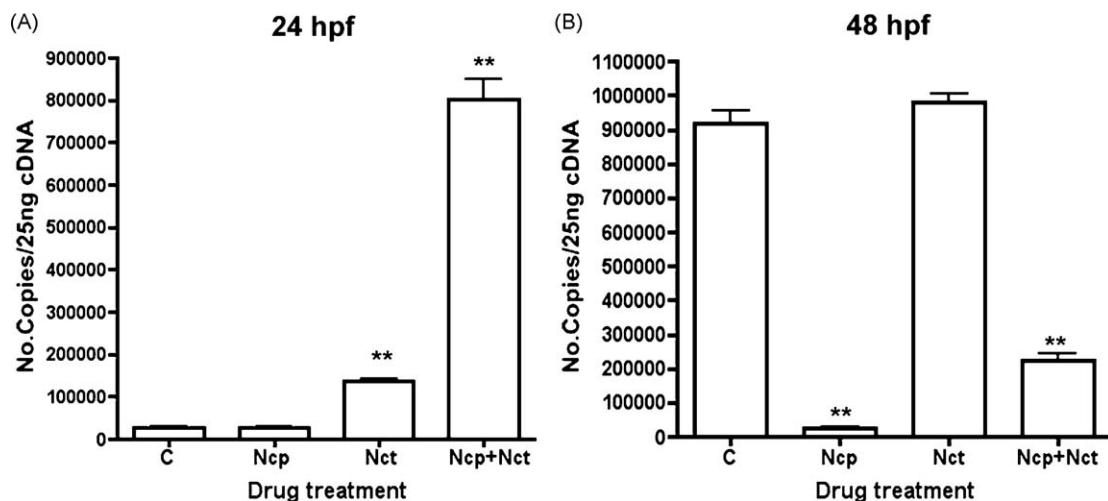


Fig. 2. (A) Absolute quantification of the changes in NOP expression at 24 hpf induced by the exposure of zebrafish embryos to 10 nM nociceptin. Nociceptin does not alter NOP expression, nocistatin increases NOP expression and the exposure to both NOP ligands considerably enhances the transcription level of this receptor. (B) Absolute quantification of changes in NOP expression at 48 hpf induced by the exposure of zebrafish embryos to 10 nM nociceptin. Nociceptin decreases NOP expression and the exposure to nocistatin before nociceptin successfully inhibits this effect. Each bar represents the number of mRNA copies of the studied receptor at each developmental stage \pm SEM. For each stage the number of experiments represented in this graph was between 6 and 9; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$ (unpaired Student's *t*-test with Welch correction).

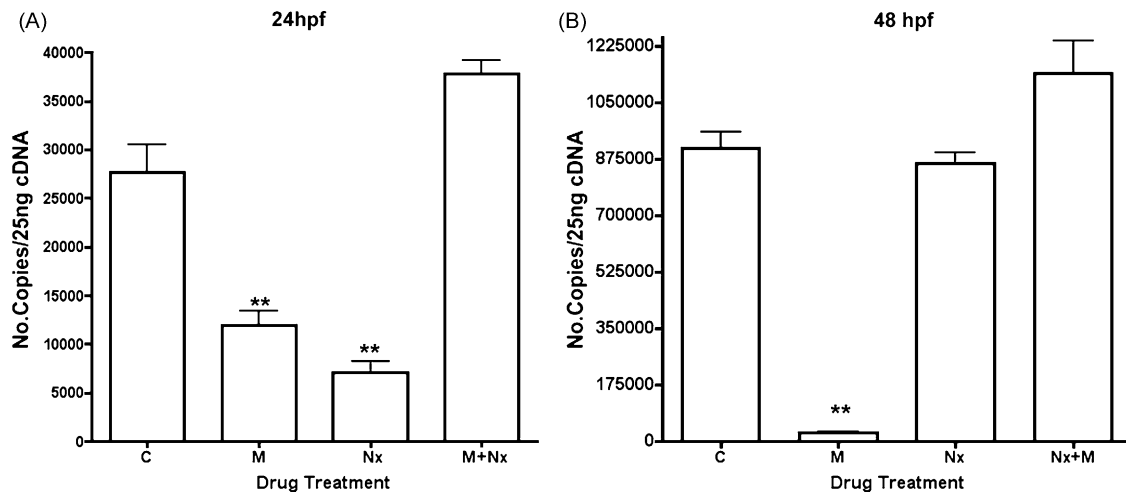


Fig. 3. (A) Absolute quantification of the changes in NOP expression at 24 hpf induced by the exposure of zebrafish embryos to 10 nM morphine. This alkaloid causes downregulation of NOP and the antagonist naloxone inhibits the effect of morphine. (B) Absolute quantification of changes in NOP expression at 48 hpf induced by the exposure of zebrafish embryos to 10 nM morphine, which induces a decrease in the number of NOP transcripts. Naloxone does not have any effect on NOP transcription, and when added to the embryonic medium before morphine, it inhibited the morphine-induced decrease in NOP expression. Each bar represents the number of mRNA copies of the studied receptor at each developmental stage \pm SEM. For each stage the number of experiments represented in this graph was between 6 and 9; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$ (unpaired Student's *t*-test with Welch correction).

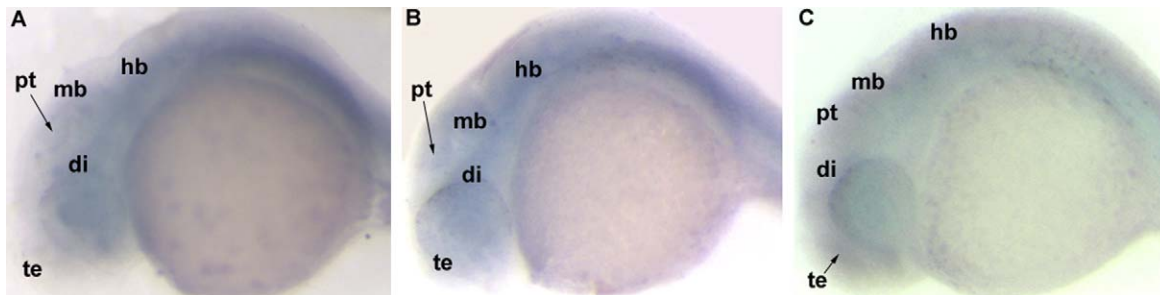


Fig. 4. Distribution of NOP in 24 hpf embryos. (A) Expression of NOP in diencephalon, *pretectum*, midbrain and hindbrain of non-treated embryos. (B) Expression of NOP in diencephalon, *pretectum*, midbrain and hindbrain of morphine-exposed embryos. (C) Expression of NOP in telencephalon, diencephalon, *pretectum*, midbrain and hindbrain of nociceptin-exposed embryos. Te: telencephalon; di: diencephalon; pt: *pretectum*; mb: midbrain; hb: hindbrain.

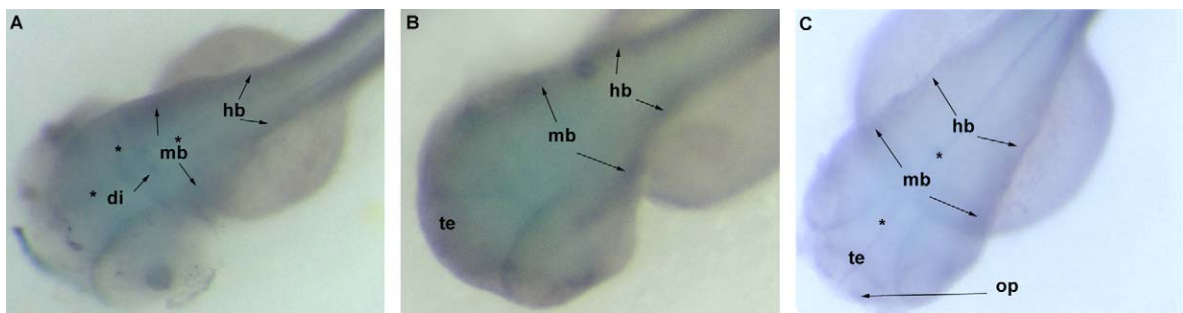


Fig. 5. Distribution of NOP in 48 hpf embryos. (A) Expression of NOP in diencephalon, midbrain, hindbrain and intersections of non-treated embryos. (B) Expression of NOP in telencephalon, midbrain, hindbrain and intersections of morphine-exposed embryos. (C) Expression of NOP in telencephalon, diencephalon, midbrain, hindbrain and intersections of nociceptin-exposed embryos. Te: telencephalon; di: diencephalon; mb: midbrain; hb: hindbrain; *: intersections.

differentiated at this stage: diencephalon, *pretectum*, midbrain, and hindbrain (Fig. 4A). In 48 hpf embryos, NOP location is restricted to the intersections between the major brain subdivisions, i.e., telencephalon, diencephalon, midbrain and hindbrain (Fig. 5A), as well as in the most caudal regions of the CNS, mainly midbrain and hindbrain. In order to detect possible changes in the distribution of NOP when embryos are exposed to drugs such as morphine or NOP endogenous agonist, nociceptin, which might alter the embryonic development, we have also performed *in situ* hybridization on morphine and nociceptin exposed embryos. Our results demonstrate that morphine does not change the distribu-

tion pattern of NOP at 24 hpf (Fig. 4B) but induces the expression of NOP in the telencephalon of 48 hpf embryos (Fig. 5B). On the other hand, nociceptin relocates its receptor at both developmental stages to more rostral brain regions, including telencephalon, in which NOP was not detected in non-treated embryos (Figs. 4C and 5C).

4. Discussion

The orphanin/FQ endogenous system is thought to be a regulator of the opioid system by exerting an antiopioid activity

in the brain (Zeilhofer and Calò, 2003; Heinricher et al., 1997). Many studies in different species also demonstrate the analgesic effect of the NOP system when a NOP agonist is administered in the spinal cord (Ko et al., 2006; Stevens et al., 2008), which points out that this system shows opposite actions depending on the anatomical region in which it is activated. Also, the NOP endogenous system is involved in neuronal differentiation and is suggested to play a role in embryonic development (Zaveri et al., 2006). Although consistent effort has been employed in the acquisition of a deeper knowledge of the biochemical maze that represents the complex signalling pathway deriving from the binding of a NOP agonist to its receptor, most of the mechanisms involved in the regulation of this system, including the transcription of the NOP receptor, remain largely unknown. Our data helps to better understand the behaviour of the NOP system by analyzing the expression of the NOP receptor during development and describing the changes on this expression produced by its endogenous ligand and by morphine.

Using the zebrafish as a model we have been able to quantify the absolute expression of NOP covering the complete embryogenesis, from 0.5 hpf to 72 hpf. We have also demonstrated that NOP is present in zebrafish embryos by *in situ* hybridization, using the 24 hpf and 48 hpf stages, the end of the Segmentation Period, when the CNS is being formed and differentiated, and the Pharyngula Period (end of organogenesis), respectively (first and second third of the zebrafish development). Although in mammals the NOP receptor mRNA is not detected by *in situ* hybridization until the second half of development, after E12 in rats and 16 weeks in humans (Neal et al., 2001), using real time PCR, a more sensitive and accurate technique, we have detected NOP transcripts very early in development, even before the embryonic transcription mechanisms are active (before 2.75 hpf, when the midblastula transition begins), as was observed for the classical opioid receptors mu, delta and kappa in zebrafish embryos (Macho Sanchez-Simon and Rodriguez, 2008). This work constitutes the first quantitation of NOP transcripts in development and adult brain, giving more accurate information on the expression of this receptor. Our data shows that the expression of the NOP receptor varies throughout the embryonic development (Fig. 1B). We have detected peaks of expression at the beginning of the midblastula transition, when the embryo transcriptional mechanisms start their activity (Newport and Kirschner, 1982), at 48 hpf, which is considered to be the end of the organogenesis, and at the end of the embryonic development (72 hpf). The number of transcripts reached at these peaks (approx. 2×10^5 , 8×10^5 and 6×10^5 copies per 25 ng of cDNA, respectively), are considerably higher than what is detected in adult zebrafish brain (less than 1.5×10^5 copies per 25 ng of cDNA), which points to the possibility that the NOP system is involved directly in development. Furthermore, as NOP expression is different in each developmental stage, this receptor might play a different role depending on the developmental period. For instance, our *in situ* hybridization studies show that NOP is present in most regions of the developing brain at 24 hpf (Fig. 4A), which is consistent with the hypothesis that NOP plays a role in the development of the CNS, as its expression increases during the Segmentation Period (16–24 hpf), when the CNS begins its subdivision into the main four regions: telencephalon, diencephalon, midbrain and hindbrain. The high increment in NOP expression detected by real time PCR at 48 hpf indicates the existence of an important role of NOP at this stage. One of the important developmental aspects occurring at the end of the organogenesis is the growth of the head, as well as the development of the sensory organs (e.g. olfactory placodes, otic vesicle, sensory hairs; Kimmel et al., 1995). As shown in Fig. 5A, NOP transcripts are detected in the subdivisions of the main brain regions, as well as in the most caudal regions of the CNS, supporting the role of NOP in the development of the head structures, including the brain.

In order to describe more accurately the behaviour of NOP during development, we have exposed zebrafish embryos to its endogenous ligand, nociceptin, simulating an overexpression of this peptide, which might mimic the response observed *in vitro* in cultured astrocytes when they are exposed to morphine (Takayama and Ueda, 2005). This response is thought to be implicated in the neuronal plasticity during chronic morphine treatment, and therefore it might be involved in the development of tolerance and dependence to opioid drugs. The increase of nociceptin in the embryo, achieved by exposing it to a 10 nM nociceptin solution, induces changes in NOP expression in a stage-dependent manner (Fig. 2). At 24 hpf, nociceptin itself does not alter NOP expression, although when the NOP antagonist nocistatin is added first to the medium, it increases the number of NOP transcripts (Fig. 2A). The absence of nociceptin-induced change in NOP expression indicates the existence of a regulatory mechanism that prevents the alteration of the transcription level of this receptor, as it may have an essential function at the beginning of the Pharyngula Period or organogenesis. While in control embryos, the expression of NOP is higher at 48 hpf than at 24 hpf, nociceptin causes a large decrease in the number of NOP copies at the end of organogenesis, over a 10-fold reduction compared to non-exposed embryos (Fig. 2B). At the 48 hpf stage, exposure to nocistatin before nociceptin inhibits the effect of the latter, maintaining the NOP expression detected in control embryos. Our results are in concordance with the data available, as the antagonist nocistatin behaves as expected by inhibiting the effect of the agonist nociceptin. Although the information given by our real time PCR data are important on their own, they are complemented by the analysis of NOP distribution obtained by means of *in situ* hybridization in nociceptin exposed embryos. At both 24 hpf and 48 hpf stages, nociceptin produces a change in the localization of NOP transcripts towards the rostral regions of the brain (Figs. 4C and 5C), mainly telencephalon, where important CNS functions reside, i.e., learning and memory, both closely related to dependence and addiction. Gallagher and Kapp (1978) already described the implication of the classical endogenous opioid system in memory processes, and therefore, the NOP system, as part of the broad opioid system, might be involved in these processes as well. These observations are in accordance to later publications, e.g., Patterson et al. (1989), who suggested that the delta opioid receptor play a role in learning in the chick. Also, as mentioned before, NOP system has an antiopioid effect and has a hyperalgesic effect at a supraspinal level and therefore, the overexpression of its endogenous agonist might increase the presence of NOP in telencephalon, where the rest of opioid receptors are detectable at 24 hpf and 48 hpf (Macho Sanchez-Simon and Rodriguez, 2008), and inhibit their activity.

Considering the close relationship between the NOP system and tolerance to morphine, we have studied the effect of this opioid agonist in the expression and distribution of NOP at 24 hpf and 48 hpf. Although morphine does not show binding affinity towards the NOP receptor, many studies indicate the existence of an interaction between NOP and MOP (mu opioid receptor, morphine's main target). This interaction not only changes the affinity characteristics of both receptors, but also alters intracellular trafficking. The most important consequence of the interaction MOP-NOP is the control of MOP tolerance to morphine, as well as its analgesic properties (Ge et al., 2007; Wang et al., 2005; Lutfy et al., 2001). However, there is lack of cross-tolerance between the analgesic effect of nociceptin and that of morphine in the rat, as was demonstrated by Hao et al., 1997. In our hands chronic exposure to morphine downregulates NOP expression at both stages analyzed (Fig. 3A and B), 24 hpf and 48 hpf, an effect inhibited by naloxone, although at 24 hpf, exposure to naloxone before morphine enhances NOP expression over control levels,

which indicates that morphine effect on NOP expression is purely opioid. Studies in adult mice tolerant to morphine show an increase in NOP expression in certain areas of the spinal cord (Ray et al., 2005), which is the suggested cause for the development of tolerance to morphine in that particular region, although it is not known whether morphine produces the same effect in other regions or in the whole organism. It is possible, as was suggested for the classical opioid receptors, that the endogenous NOP system behaves in a different way in embryos than in adults. The decrease of NOP expression in embryos exposed chronically to morphine at different stages suggest the existence of a regulatory system that protects the embryos from the development of tolerance to morphine and therefore, from the adverse effect of this opioid alkaloid, which, when given to pregnant mothers, produces foetal malformations and alterations of the reward circuit (Romano and Harvey, 1998; Bandstra et al., 2002; Morrow et al., 2003). As shown in Fig. 4B the distribution of NOP in embryos at 24 hpf is not altered when they are exposed to morphine, which points out that the changes induced by morphine in NOP expression do not produce a switch in NOP activity, at least, region-related activity, such as the one described for the alterations induced by nociceptin (hyperalgesia at supraspinal level and analgesia at spinal level). On the contrary, in 48 hpf embryos, morphine induces the expression of NOP in telencephalon (Fig. 5B), which indicates, together with the results obtained in nociceptin exposed embryos at this same stage, a possible role of NOP in neuronal plasticity after a long-term treatment with morphine.

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Grant no. SAF2007-61581) and the Government of Castilla y León (Grant no. SA0800A5); FMSS is supported by a grant from Junta de Castilla y León.

References

- Bandstra, E.S., Morrow, C.E., Vogel, A.L., Fifer, R.C., Ofir, A.Y., Dausa, A.T., Xue, L., Anthony, J.C., 2002. Longitudinal influence of prenatal cocaine exposure on child language functioning. *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 297–308.
- Fishman, M.C., 2001. Genomics. Zebrafish—the canonical vertebrate. *Science* 294, 1290–1291.
- Gallagher, M., Kapp, B.S., 1978. Manipulation of opiate activity in the amygdala alters memory processes. *Life Sci.* 23, 1973–1977.
- Ge, Z.J., Li, C., Zhang, L.C., Zeng, Y.M., Cao, J.L., Dai, T.J., Wang, J.K., Cui, G.X., Tan, Y.F., Zhao, Y.P., Liu, G.J., 2007. Involvement of local orphanin FQ in the development of analgesic tolerance induced by morphine microinjections into the dorsal raphe nucleus of rats. *Neurosci. Lett.* 413, 233–237.
- Hao, J.X., Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X.J., 1997. Lack of cross-tolerance between the antinociceptive effect of intrathecal orphanin FQ and morphine in the rat. *Neurosci. Lett.* 223, 49–52.
- Hauser, K.F., McLaughlin, P.J., Zagon, I.S., 1987. Endogenous opioids regulate dendritic growth and spine formation in developing rat brain. *Brain Res.* 416, 157–161.
- Heinricher, M.M., McGaraughty, S., Grandy, D.K., 1997. Circuitry underlying anti-opioid actions of orphanin FQ in the rostral ventromedial medulla. *J. Neurophysiol.* 78, 3351–3358.
- Isayama, T., McLaughlin, P.J., Zagon, I.S., 1991. Endogenous opioids regulate cell proliferation in the retina of developing rat. *Brain Res.* 544, 79–85.
- Kim, E., Clark, A.L., Kiss, A., Hahn, J.W., Wesselschmidt, R., Coscia, C.J., Belcheva, M.M., 2006. Mu- and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors. *J. Biol. Chem.* 281, 33749–33760.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Ko, M.C., Wei, H., Woods, J.H., Kennedy, R.T., 2006. Effects of intrathecally administered nociceptin/orphanin FQ in monkeys: behavioral and mass spectrometric studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 1257–1264.
- Korostynski, M., Piechota, M., Kaminska, D., Solecki, W., Przewlocki, R., 2007. Morphine effects on striatal transcriptome in mice. *Genome Biol.* 8, R128.
- Lambert, D.G., 2008. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 694–710.
- Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8, 353–367.
- Lutfy, K., Hossain, S.M., Khaliq, I., Maidment, N.T., 2001. Orphanin FQ/nociceptin attenuates the development of morphine tolerance in rats. *Br. J. Pharmacol.* 134, 529–534.
- Macho Sanchez-Simon, F., Rodriguez, R.E., 2008. Developmental expression and distribution of opioid receptors in zebrafish. *Neuroscience* 151, 129–137.
- Marquez, P., Nguyen, A.T., Hamid, A., Lutfy, K., 2008. The endogenous OFQ/N/ORL-1 receptor system regulates the rewarding effects of acute cocaine. *Neuropharmacology* 54, 564–568.
- Meunier, J.C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., Monsarrat, B., et al., 1995. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377, 532–535.
- Morrow, C.E., Bandstra, E.S., Anthony, J.C., Ofir, A.Y., Xue, L., Reyes, M.B., 2003. Influence of prenatal cocaine exposure on early language development: longitudinal findings from four months to three years of age. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 24, 39–50.
- Narita, M., Kuzumaki, N., Miyatake, M., Sato, F., Wachi, H., Seyama, Y., Suzuki, T., 2006. Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J. Neurochem.* 97, 1494–1505.
- Neal Jr., C.R., Akil, H., Watson Jr., S.J., 2001. Expression of orphanin FQ and the opioid receptor-like (ORL1) receptor in the developing human and rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* 22, 219–249.
- Newport, J., Kirschner, M., 1982. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. II. Control of the onset of transcription. *Cell* 30, 687–696.
- Nüsslein-Volhard, C., Dahm, R., 2002. Zebrafish. Oxford University Press.
- Patterson, T.A., Schulteis, G., Alvarado, M.C., Martinez Jr., J.L., Bennett, E.L., Rosenzweig, M.R., Hruby, V.J., 1989. Influence of opioid peptides on learning and memory processes in the chick. *Behav. Neurosci.* 103, 429–437.
- Ray, S.B., Gupta, Y.K., Wadhwa, S., 2005. Expression of opioid receptor-like 1 (ORL1) & mu opioid receptors in the spinal cord of morphine tolerant mice. *Indian J. Med. Res.* 121, 194–202.
- Reinscheid, R.K., Nothacker, H.P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma Jr., F.J., Civelli, O., 1995. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270, 792–794.
- Romano, A.G., Harvey, J.A., 1998. Prenatal cocaine exposure: long-term deficits in learning and motor performance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 846, 89–108.
- Sakoori, K., Murphy, N.P., 2008. Endogenous nociceptin (orphanin FQ) suppresses basal hedonic state and acute reward responses to methamphetamine and ethanol, but facilitates chronic responses. *Neuropsychopharmacology* 33, 877–891.
- Sakoori, K., Murphy, N.P., 2004. Central administration of nociceptin/orphanin FQ blocks the acquisition of conditioned place preference to morphine and cocaine, but not conditioned place aversion to naloxone in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 172, 129–136.
- Shin, J.T., Fishman, M.C., 2002. From Zebrafish to human: modular medical models. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3, 311–340.
- Stevens, C.W., Martin, K.K., Stahlheber, B.W., 2008. Nociceptin produces antinociception after spinal administration in amphibians. *Pharmacol. Biochem. Behav.*
- Takayama, N., Ueda, H., 2005. Morphine-induced overexpression of prepro-nociceptin/orphanin FQ in cultured astrocytes. *Peptides* 26, 2513–2517.
- Thisse, C., Thisse, B., Schilling, T.F., Postlethwait, J.H., 1993. Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development* 119, 1203–1215.
- Wang, H.L., Hsu, C.Y., Huang, P.C., Kuo, Y.L., Li, A.H., Yeh, T.H., Tso, A.S., Chen, Y.L., 2005. Heterodimerization of opioid receptor-like 1 and mu-opioid receptors impairs the potency of micro receptor agonist. *J. Neurochem.* 92, 1285–1294.
- Westerfield, M., 1995. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*) University of Oregon, Eugene.
- Zaratin, P.F., Petrone, G., Sbacchi, M., Garnier, M., Fossati, C., Petrillo, P., Ronzoni, S., Giardina, G.A., Scheideler, M.A., 2004. Modification of nociception and morphine tolerance by the selective opiate receptor-like orphan receptor antagonist (–)-cis-1-methyl-7-[4-(2,6-dichlorophenyl)piperidin-1-yl]methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-5-ol (SB-612111). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 454–461.
- Zagon, I.S., Zagon, E., McLaughlin, P.J., 1989. Opioids and the developing organism: a comprehensive bibliography, 1984–1988. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 13, 207–235.
- Zaveri, N.T., Waleh, N., Toll, L., 2006. Regulation of the prepronociceptin gene and its effect on neuronal differentiation. *Gene* 384, 27–36.
- Zeilhofer, H.U., Calò, G., 2003. Nociceptin/orphanin FQ and its receptor—potential targets for pain therapy? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 423–429.

**3. Sanchez-Simon FM, Arenzana FJ and Rodriguez RE (2010)
In vivo effects of morphine on neuronal fate and opioid
receptor expression in zebrafish embryos. *Eur J Neurosc*
32(4):550-559.**

In vivo effects of morphine on neuronal fate and opioid receptor expression in zebrafish embryos

Fatima Macho Sanchez-Simon,¹ Francisco J. Arenzana¹ and Raquel E. Rodriguez²

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Neurosciences of Castilla y Leon (INCYL), University of Salamanca, Salamanca, Spain

²C/Pintor Fernando Gallego, 1, Lab 13, Salamanca 37007, Spain

Keywords: cell proliferation, neuronal differentiation, neuroprotection, qPCR

Abstract

Morphine remains one of the most potent analgesic compounds used to control chronic pain despite its known adverse effects. It binds to the opioid receptors mu, delta and kappa, which are involved in aspects of neuronal fate such as cell proliferation, neuroprotection and neuronal differentiation. However, the effect of morphine on these processes is controversial and *in vitro* studies, as well as *in vivo* studies on adults and neonates in mammalian models, have not been able to clarify the diverse roles of morphine in the central nervous system. We have used zebrafish embryos to determine *in vivo* how morphine affects neuronal fate and opioid receptor gene expression and to elucidate if there is a link between these processes. Our results show that at 24 and 48 h post fertilization (hpf) morphine enhances cell proliferation, although it has opposing effects as an inducer of neuronal differentiation at these two stages, increasing the number of certain neuronal populations at 24 hpf and decreasing it at 48 hpf. The present study also demonstrates that in 24-hpf embryos morphine acts as a neuroprotector against glutamate damage in motor neurons and Pax-6-positive neurons. Furthermore, the gene expression of the opioid receptors is altered by embryonic exposition to morphine. In conclusion, our study sheds new light on the *in vivo* roles of morphine, and it indicates for the first time that its implication in cell proliferation and neuroprotection might be related to changes in the gene expression of opioid receptors.

Introduction

Morphine is a highly potent opioid analgesic and the treatment of choice in the control of chronic pain, although its continuous administration produces adverse effects, such as respiratory depression, constipation or embryonic malformations (Mao & Mayer, 2001; Narita *et al.*, 2005). Morphine exerts its activity through the opioid receptors [μ (MOR), δ (DOR) and κ (KOR)], the specific binding sites of opiate substances in the organism, and fundamental pieces of the addiction-development machinery (reviewed by Waldhoer *et al.*, 2004). The continuous activation of these receptors alters their trafficking properties and causes the development of tolerance to opioid agents. Opioid receptors are also involved in the development of addiction to other drugs such as nicotine or cannabinoids (Paquette & Olmstead, 2005).

Morphine has been implicated in the upregulation of apoptosis-related genes and the downregulation of cytoskeleton and nuclear proteins involved in cell proliferation in mice (Korostynski *et al.*, 2007). In contrast, it has been demonstrated that morphine enhances cell proliferation and neuronal protection, and also affects neuronal differentiation (reviewed by Berrios *et al.*, 2008). These opposite results obtained from mammalian models have raised controversy on

the real actions of morphine in the organism and through which mechanisms morphine exerts its diverse effects, positive and negative.

The mammalian models used in these *in vitro* studies have not been able to resolve the controversy on the effects of morphine, which highlights the need for an *in vivo* model. The zebrafish opioid system has been described in detail (Barrallo *et al.*, 1998a,b; Alvarez *et al.*, 2006; Pinal-Seoane *et al.*, 2006; Marron Fdez. de Velasco *et al.*, 2009) and it shares high homology with its mammalian counterpart. In addition, it has been shown that the gene expression of the opioid receptors in zebrafish is different at each developmental stage, suggesting that these receptors are implicated in mechanisms of development (Macho Sanchez-Simon & Rodriguez, 2008). The mammalian opioid receptors are also differentially expressed in development, as well as their endogenous ligands, whose absence causes alterations in the development of the brain (Hauser *et al.*, 1987; Spencer-Dene *et al.*, 1994). Also, zebrafish embryos have proven to be a good model to study disease-related pathways (Fishman, 2001; Trede *et al.*, 2004). As the opioid system seems to behave the same way in mammals as in zebrafish in adults and embryos, we have used this model to shed light on the effect of morphine on the central nervous system (CNS), relating, for the first time, the effect of morphine in neuronal fate to morphine-induced changes in opioid receptor gene expression. Here we analyse the effects of morphine on zebrafish embryos at 24 and 48 h post fertilization (hpf). Both stages represent important milestones in embryonic development, as the

Correspondence: Dr R. E. Rodriguez, as above.
E-mail: requelmi@usal.es

Received 18 January 2010, revised 6 May 2010, accepted 10 May 2010

prim-5 stage (24 hpf) determines the end of the segmentation period, during which the CNS is being formed and neuronal differentiation begins (Kimmel *et al.*, 1995), and the long-pec stage (48 hpf) defines the end of organogenesis.

Materials and methods

Fish maintenance and breeding

AB zebrafish (*Danio rerio*) embryos were raised and bred in our facilities as previously described (Macho Sanchez-Simon & Rodriguez, 2008). Fertilized embryos were selected using a stereo microscope (Leica Z2000, Nussloch, Germany), collected within 2 h of fertilization and maintained at 28.5°C in Petri dishes containing sterile E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄ in distilled water; Sigma, Madrid, Spain). Animals were handled according to the guidelines of the European Community Council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), current Spanish Legislation (BOE 67/8509-12, 1998) and following the Guide for the Care and Use of Laboratory animals as adopted and promulgated by the US National Institute of Health.

Drug treatment

Three concentrations of morphine (provided by the Spanish Ministry of Health), 1, 10 and 100 nM, were used to treat embryos during three different developmental periods, 5–24, 5–48 and 5–72 hpf, in order to determine the lowest observed effect concentration (LOEC). A 100 nM dose of morphine produced important malformations or death in all embryos, and 1 nM did not produce any effect in the gene expression of opioid receptors, which is part of this study. Hence we considered that the LOEC for the three groups was 10 nM. Zebrafish embryos were exposed to 10 nM morphine from 5 to 24 hpf and from 5 to 48 hpf. In order to observe if naloxone inhibits the effects produced by morphine, we exposed zebrafish embryos only to 1 μM naloxone (provided by the Spanish Ministry of Health) from 3 to 24 hpf and from 3 to 48 hpf, and also first to naloxone (1 μM) from 3 to 5 hpf and then to both naloxone (1 μM) and morphine (10 nM) from 5 to 24 and from 5 to 48 hpf.

High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) analysis

Zebrafish embryos were exposed to 10 nM morphine from 5 to 24 hpf and from 5 to 48 hpf, and were then collected. Embryos at the two developmental stages were washed three times for 5 min each in E3 medium and dechorinated. Dechorination was performed in order to quantify the real morphine concentration in embryonic tissue, as the chorion might prevent morphine from entering the embryo. Embryos were kept at –20°C. Samples were defrosted first at 4°C (1 h) and then at room temperature. After adding 1 ml of 10 mM ammonium formate, pH 9.3 (Dienes-Nagy *et al.*, 1999), samples were mechanically homogenized with a Polytron on ice. Homogenized embryonic tissue was centrifuged for 30 min at 4000 g at 4°C and the supernatants were collected and kept at 4°C (Dienes-Nagy *et al.*, 1999) until HPLC-MS analysis. Six samples per developmental stage (200 embryos were used per sample) were analysed by HPLC-MS. HPLC-MS analyses were performed as previously described (Dienes-Nagy *et al.*, 1999) using a Waters ZQ 4000 with an alliance HT HPLC apparatus. HPLC conditions were as follows: column, Atlantis T3, 3 μm, 2.1 × 100 mm; solution A, 10 mM ammonium formate, pH 7.0,

in H₂O; solution B, methanol. Initial conditions were 30% B and a gradient was performed over 11 min to reach 100% B. The 286 and 289 u.m.a. signals were recorded and integrated in SIM mode. Morphine-D₃ was used as an internal deuterated standard (Cerrilliant, Round Rock, TX, USA). Using the described methodology, close to 0.495 ± 0.0387 nM of morphine was detected in each embryo, which represents 5% of the initial concentration of 10 nM morphine used.

Analysis of morphine-induced changes in cell proliferation

Cell proliferation was analysed in three experimental groups [control (no drug), 10 nM morphine, and 1 μM naloxone + 10 nM morphine] using phosphorylated histone-3 (H3P) as a cellular division marker (Weber *et al.*, 2008). Two different batches of ten embryos per batch were used per experimental group. Embryos were killed at 24 and 48 hpf by direct fixation in 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA; Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS) overnight at 4°C and they were stored in methanol (Sigma) at –20°C for at least 1 day. After rehydration, embryos were embedded in a 1.5% (w/v) agar solution with 10% (w/v) sucrose (Sigma). Agar blocks were immersed in a 30% (w/v) sucrose-phosphate buffer (PB) solution and left overnight at room temperature. Agar blocks containing the embryos were directly frozen in the cryostat (Leica Microm HM 560). Cryosections (12 μm) were dried at room temperature, rehydrated in PBS with 0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma) and blocked in PBS-Tween 20 with 5% (v/v) goat serum (Sigma) for 3 h at room temperature. For immunodetection, sections were incubated with a mouse anti-H3P antibody (Ab) (1 : 500; Abcam, Cambridge, UK) overnight at room temperature. The slides were then washed in PBS and incubated with a goat Alexa-488 conjugated anti-mouse secondary Ab (1 : 500; Invitrogen, Barcelona, Spain) for 1 h at room temperature. After incubation with this Ab, slides were washed again with PBS, incubated for 10 min with DAPI (1 : 10 000; Sigma) in order to visualize cellular nuclei (which helps to identify the embryo orientation), and washed with PBS.

Analysis of morphine-induced changes in neuronal differentiation

In addition to the H3P immunohistochemistry, 12-μm cryosections obtained from embryos at 24 and 48 hpf from the groups described in the previous section were used to detect Pax-6 and Pax-2, respectively, two transcription factors present in differentiating interneurons at the spinal cord and in the midbrain–hindbrain boundaries (Batista & Lewis, 2008). The Pax-2 antibody used in the 48-hpf embryos could not be used in 24-hpf embryos, as in these embryos Pax-2 could not be detected, although Pax-2 transcripts are present (Pfeffer *et al.*, 1998). Therefore, Pax-6, another member of the Pax-gene family, has been studied, considering that these genes are expressed in the same anatomical regions (Li Song & Joyner, 2000). The primary Ab used were rabbit anti-Pax-6 (1 : 500; Covance, Madrid, Spain), and rabbit anti-Pax-2 Ab (1 : 500; Abcam), and an Alexa-565 goat anti-rabbit Ab (1 : 500; Invitrogen) was used as a secondary Ab. Lack of reactivity of the primary antibodies with other zebrafish proteins is proven by the use of these antibodies in previous works by other groups or by analysis of the protein sequence homology considering the information provided by the manufacturers (Ab anti-histone from Abcam used by Rai *et al.*, 2006 and Wardle *et al.*, 2006; Ab anti-Pax-2 from Abcam shares sequence with the Ab anti-Pax-2 used by Riley *et al.*, 1999; Ab anti-Pax-6 from Covance shares sequence with the Ab anti-Pax-6 synthesized by Macdonald *et al.*, 1994; Ab anti-calretinin from Swant is used by the manufacturers in zebrafish).

Analysis of morphine-induced neuronal protection

Embryos at 5 hpf were divided into four experimental groups: control embryos, embryos exposed to 10 nM morphine, embryos exposed to 1 μ M glutamate (Tocris Bioscience, Bristol, UK) and embryos exposed simultaneously to glutamate (1 μ M) and morphine (10 nM). Glutamate is a well-known toxic substance that acts predominantly in the brain, where most of its receptors are localized (Choi, 1988). An original concentration of 100 μ M was used and we observed 100% embryonic death. Hence embryos were exposed to lower concentrations, i.e. 10 and 1 μ M. The 10 μ M concentration produced important malformations, especially in the forebrain, which is an essential region in our study. The 1 μ M concentration did not produce visible malformations, but it reduced the number of neurons and therefore 1 μ M was the glutamate concentration chosen for this study. Whole mount immunohistochemistry was performed on embryos from the four experimental groups (two batches of ten embryos per batch per experimental group) to detect calretinin (mouse anti-calretinin, Ab 1 : 250; Swant, Bellinzona, Switzerland), which is a motor neuron marker (Levanti *et al.*, 2008), and Pax-6 (rabbit anti-Pax-6 Ab 1 : 500; Covance), a marker of a specific neuronal population (Marquardt *et al.*, 2001). Embryos were killed at 24 hpf, fixed in 4% PFA-PBS (w/v) overnight at 4°C and stored in methanol at -20°C for at least 1 day. Whole mount immunohistochemistry was performed as previously reported (Karlstrom *et al.*, 1999). The following secondary Abs were used: Alexa 488 goat anti-mouse (Invitrogen, 1 : 500) and Alexa 565 goat anti-rabbit (Invitrogen, 1 : 500) for each primary Ab.

Image analysis

The images obtained via immunohistochemistry from slides were taken with an Olympus AX70 epifluorescence microscope (Tokyo, Japan). A 10 \times objective (numerical aperture 0.30) was used so the total magnification was 10. The images obtained from the whole mount immunohistochemistry were taken with a Leica fluorescence stereoscope with 12 \times magnification. All images were processed with Photoshop CS3 software (Adobe System Inc.) following the guidelines established by the Rockefeller University Press. Counting of proliferating cells and Pax-26- or Pax-2-positive neurons on slides was achieved using ImageJ freeware (NCBI).

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Quantification of expression levels of opioid receptors was determined in embryos from the four experimental groups (control, morphine exposed, naloxone exposed, morphine + naloxone exposed) at two developmental stages: 24 and 48 hpf. Two hundred embryos at 24 hpf and 150 embryos at 48 hpf were used per sample. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) following the protocol recommended by the manufacturers. In order to avoid amplification on genomic DNA, RNA samples were treated with DNase I (Roche Scientific, Madrid, Spain) following the protocol recommended by the manufacturers. RNA concentrations were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA), each RNA sample was assayed three times and an average value determined. RNA quality was assessed on an RNA 6000 NanoLabChip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), using an Agilent 2100 Bioanalyzer to assess the integrity of the 18S and 28S rRNA bands, and an RNA integrity number (RIN), with 0 corresponding to fully degraded RNA and 10 corresponding to

intact RNA. For all qPCR, only RNA samples with an RIN of at least 7.5 were used, with the vast majority of samples having an RIN of at least 8.0. cDNA synthesis was carried out by reverse transcription of total RNA to cDNA using the Promega Corp. (Madison, WI, USA) reverse transcription kit as previously described (Macho Sanchez-Simon & Rodriguez, 2008). The concentration of cDNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm with a SmartSpec™ Plus spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Quantification of the PCR products was performed using the SYBR-Green method as previously described (Macho Sanchez-Simon & Rodriguez, 2008). The primers used to amplify qPCR fragments of the four opioid receptors from zebrafish have been designed avoiding nonspecific annealing intra- and inter-species, using the Blast tool provided by Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). The Blast tool compares the studied sequence, in our case the zebrafish opioid receptors nucleotide sequence, with the whole genome of the zebrafish and other species genomes (rat, human, drosophila, medaka, etc.). When two or more bases of the primers anneal to different sequences from those we want to amplify, they are discarded. In most cases, at least one of the primers used to amplify each opioid receptor was design in interexonic sequences in order to avoid amplification on genomic DNA. The oligonucleotides used to amplify the different opioid receptors were: *ZfMOR* F: ACGAGCTGTGCAAGATTGTG; *ZfMOR* R: CCGATTGCAGATGAAAGGAT; *ZfDOR1* F: ACTATGATGAGCGTGGACCGTT; *ZfDOR1* R: GCGGAGGAGAGGATC-CAGAT; *ZfDOR2* F: TCAGGCAAAAACAATCTGCATG; *ZfDOR2* R: CAGGATCATCAGGCCGTAGC; *ZfKOR* F: CATGTTACCA-GTATCTTCACTTTGA; *ZfKOR* R: ACACTCTGTCGTGCCATT-GTTC. Amplicons for each set of primers are shown in Fig. 1. PCR products were amplified in an ABI Prism 7300 detection system (Applied Biosystems, Madrid, Spain), with the following conditions: 10 min at 95°C followed by 36 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 55°C. Three PCR reactions were performed for each sample per plate, and each experiment was repeated three times. The elongation factor 1 alpha (*EF1 α*) has been used as a housekeeping gene.

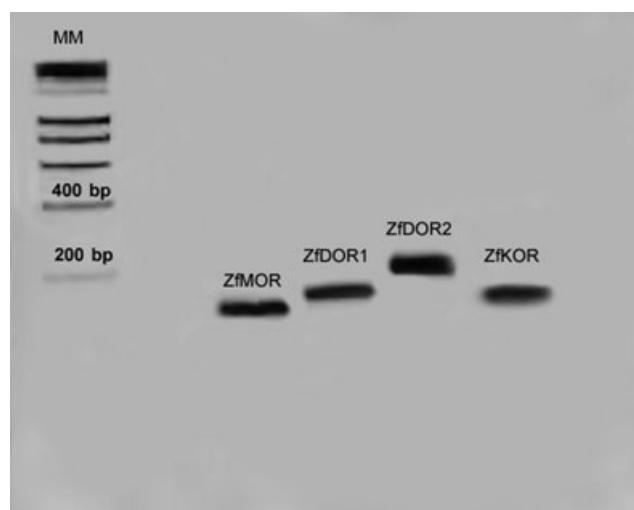


FIG. 1. PCR products obtained from the amplification of the opioid receptors *ZfMOR*, *ZfDOR1*, *ZfDOR2* and *ZfKOR* with the set of primers (forward and reverse) used for the qPCR. MM, molecular marker.

Statistical analysis

The quantitative analysis of the proliferative cells and Pax-6- and Pax-2-positive neurons (see Fig. 3) and the qPCR results are expressed as mean \pm SEM. The results for each experimental group were compared with those observed in the control group, using unpaired Student's *t*-test with Welch correction; $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with GRAPHPAD PRISM 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Determination of the amount of morphine that enters zebrafish embryos

Quantification of the amount of morphine that enters zebrafish embryos at the stages of 24 and 48 hpf, determined by HPLC-MS, showed that after chronic exposure to 10 nM morphine (after 5 hpf), close to 5% of the morphine diluted in the E3 medium (final concentration of 10 nM) ($4.56 \pm 1.44\%$; $n = 6$ different determinations per developmental stage) is detected in the embryo. We have not observed any differences in the quantity of morphine within the embryo between the 24- and the 48-hpf group.

Morphine-induced changes in cell proliferation (H3P+) and neuronal differentiation (Pax-6+, Pax-2+)

We have analysed the effects of morphine in different processes involved in neuronal fate, such as cell proliferation and neuronal differentiation. Our immunohistochemical studies using an anti-H3P antibody show that, at the 24-hpf stage, morphine significantly increases the number of proliferating cells (H3P+) compared with the control group (Figs 2A–C and 3). This increase is detected mainly in the midbrain, where most of the structures related to pain and addiction are found, whereas in the control group H3P-positive cells are more abundant in the rostral regions of the forebrain (Figs 2A and 3). As can be seen in Fig. 2B, at 48 hpf proliferating cells are found mainly in the dorsal tectum and ventral diencephalon, midbrain and hindbrain, although some dividing cells are detected in the most rostral region of the forebrain. Morphine increases the number of dividing cells in the dorsal diencephalon, midbrain and cerebellum (Figs 2D and 3). Naloxone by itself does not have any major effect on the number of proliferative cells at either developmental stage (Figs 2E and F, and 3). The effects produced by morphine on proliferation at both developmental stages are successfully inhibited by naloxone (Figs 2G and H, and 3).

As both 24- and 48-hpf embryos have differentiated neuron populations in the forebrain, we analysed the effect of morphine on neuronal differentiation, using the transcription factors Pax-6 in 24-hpf embryos and Pax-2 in 48-hpf embryos as markers of neuronal populations (Huang *et al.*, 2008). Although Pax-2 transcripts are present at 24 hpf (Li Song & Joyner, 2000), the protein is not detected at this stage and therefore Pax-6 was used at this developmental stage. Our immunohistochemistry results show that morphine produces a significant increase in the number of Pax-6-positive neurons in the midbrain at 24 hpf but induced a decrease in the number of Pax-2-positive neurons at 48 hpf in both the midbrain and hindbrain (Figs 2C and D, and 3C and D), which is reversed by naloxone when embryos are exposed simultaneously to both morphine and naloxone (Figs 2G and H, and 3). When embryos were exposed to naloxone alone, no changes in the number of Pax-6- or Pax-2-positive cells were observed (Figs 2E and F, and 3).

Morphine-mediated neuronal protection

We also studied the effect of morphine on the number of a specific population of differentiated neurons (motor neurons and Pax-6-positive neurons) in 24-hpf embryos, as well as its possible role as a neuronal protector. Embryos at the 48-hpf stage were not studied as they had to be treated with phenyl-thio-urea (PTU) in order to inhibit pigmentation, and they could not survive the joint treatment with both PTU and glutamate. We have studied *in vivo* the preventative effect that morphine has against the neuronal damage produced by glutamate through the detection of the motor neuron markers calretinin and the differentiating neuronal marker Pax-6. Our results show that morphine increases the number of both calretinin- and Pax-6-positive neurons in the treated as compared with the untreated embryos (Fig. 4A and B). Calretinin-positive neurons (motor neurons) are mainly localized in dorso-caudal regions, whereas neurons positive to Pax-6 are found mainly in the rostral region of the forebrain, although Pax-6-positive neurons can also be observed in the midbrain (Fig. 4A). In contrast, embryonic exposure to glutamate reduces the number of motor neurons compared with control and morphine-exposed embryos (Fig. 4A–C). Also, glutamate eliminates Pax-6-positive neurons from the embryo forebrain and midbrain. However, the loss of neurons produced by glutamate is effectively prevented by previous exposure to morphine, and motor neurons and Pax-6-positive neurons are detected in the same regions as in control embryos (Fig. 4D).

Gene expression levels of zebrafish opioid receptors after morphine exposure

The effects produced by morphine on cell proliferation, neuronal differentiation and neuronal protection might be a consequence of morphine-induced changes in the gene expression of its receptors (opioid receptors). Hence, we have studied by qPCR the effect of morphine on the transcription level of *ZfMOR*, *ZfDOR1*, *ZfDOR2* and *ZfKOR* at two developmental stages, 24 and 48 hpf. When zebrafish embryos are chronically exposed (from 5 hpf onwards) to a 10 nM morphine solution the expression of the opioid receptors changes (Fig. 5). The changes in the transcription level of each receptor are different depending on the type of receptor and on the assayed developmental stage.

The gene expression of the zebrafish mu opioid receptor (Barrallo *et al.*, 2000; *ZfMOR*, GenBank accession no.: NM_131707) in control animals at 24 hpf almost reached 150 000 copies per 25 ng of cDNA (Fig. 5A). When 24-hpf embryos were exposed to morphine, no significant changes in the transcription level of *ZfMOR* were observed compared with *ZfMOR* gene expression in the control group, whereas its gene expression doubled after naloxone administration. The highest peak of expression at 24 hpf was detected when embryos were exposed to naloxone and morphine (Fig. 5A). At 48 hpf, the end of organogenesis, neither morphine nor naloxone affected the gene expression level of *ZfMOR* when administered separately. In contrast, the transcription of this receptor decreased significantly when embryos were exposed to both agents (Fig. 5B).

We have previously shown that the zebrafish has two delta opioid receptors, considered to be duplicates: *ZfDOR1* (Barrallo *et al.*, 1998a,b; GenBank accession no.: NC_007130.2) and *ZfDOR2* (Pinal-Seoane *et al.*, 2006; GenBank accession no.: NM_212755). The gene expression profiles of these duplicate receptors differ during development, which is interesting given the close molecular homology found between them (Macho Sanchez-Simon & Rodriguez, 2008). Hence we analysed the changes in the gene expression of *ZfDOR1* and *ZfDOR2* produced as a consequence of embryonic exposure to morphine. In

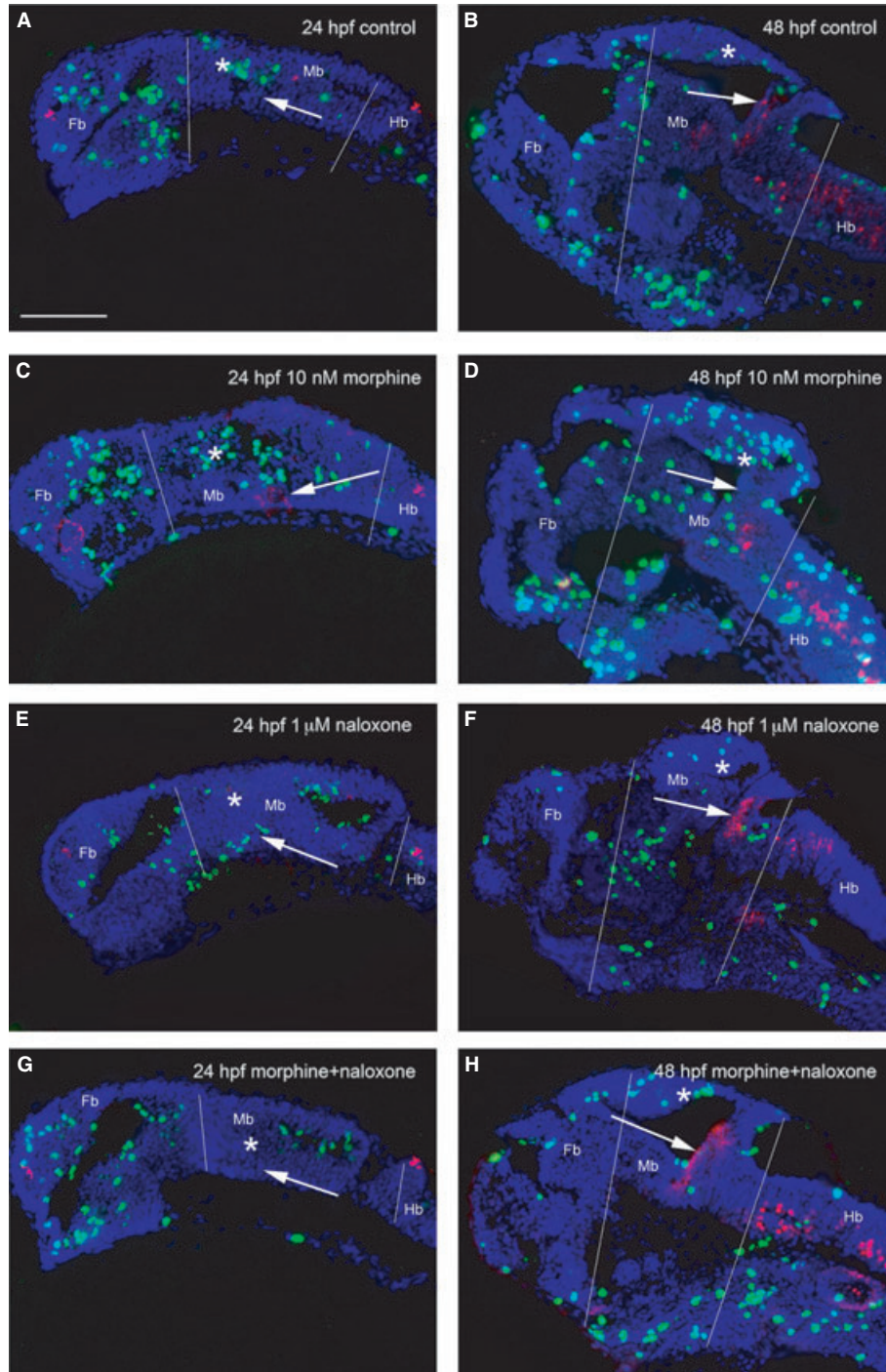


FIG. 2. Changes induced by morphine in cell proliferation and neuronal differentiation. Proliferative cells are shown in green and Pax-2-positive cells in red. (A) Distribution of proliferative cells (H3P+) at the 24-hpf stage in rostral forebrain, midbrain (*) and hindbrain in control embryos. Distribution of Pax-6-positive neurons in 24-hpf embryos (the arrow shows the absence of Pax-6-positive neurons in ventral midbrain). (B) Distribution of proliferative cells in 48-hpf control embryos in tectum and ventral diencephalon, midbrain (*) and hindbrain, and some dividing cells are also detected in rostral forebrain. Distribution of differentiated Pax-2-positive neurons in midbrain and hindbrain (arrow). (C) Morphine significantly increases the number of proliferative cells at 24 hpf mainly in midbrain (*), as well as the number of Pax-6-positive neurons (arrow). (D) Significant increase of dividing cells (at 48 hpf), mostly in midbrain (*) and cerebellum. Decrease of Pax-2-positive neurons in midbrain produced by morphine (arrow). (E) Exposure to naloxone does not change the pattern of proliferative cells (*) and Pax-6-positive neurons (the arrow shows the absence of Pax-6-positive neurons in ventral midbrain). (F) Exposure to naloxone does not change the pattern of proliferative cells (*) and Pax-2 positive neurons (arrow). (G) Inhibition of morphine-induced increase of proliferative cells at 24 hpf by naloxone, especially in midbrain (*). (H) Inhibition of morphine-induced increase of proliferative cells at 48 hpf by naloxone, mainly in midbrain (*), as was observed at 24 hpf. Inhibition of morphine-induced reduction of Pax-2-positive neurons by naloxone in midbrain (arrow). Scale bar = 100 μ m. Fb, forebrain; Mb, midbrain; Hb, hindbrain. Encephalic subdivisions have been made considering the morphological study done by Hauptmann & Gerster (2000).

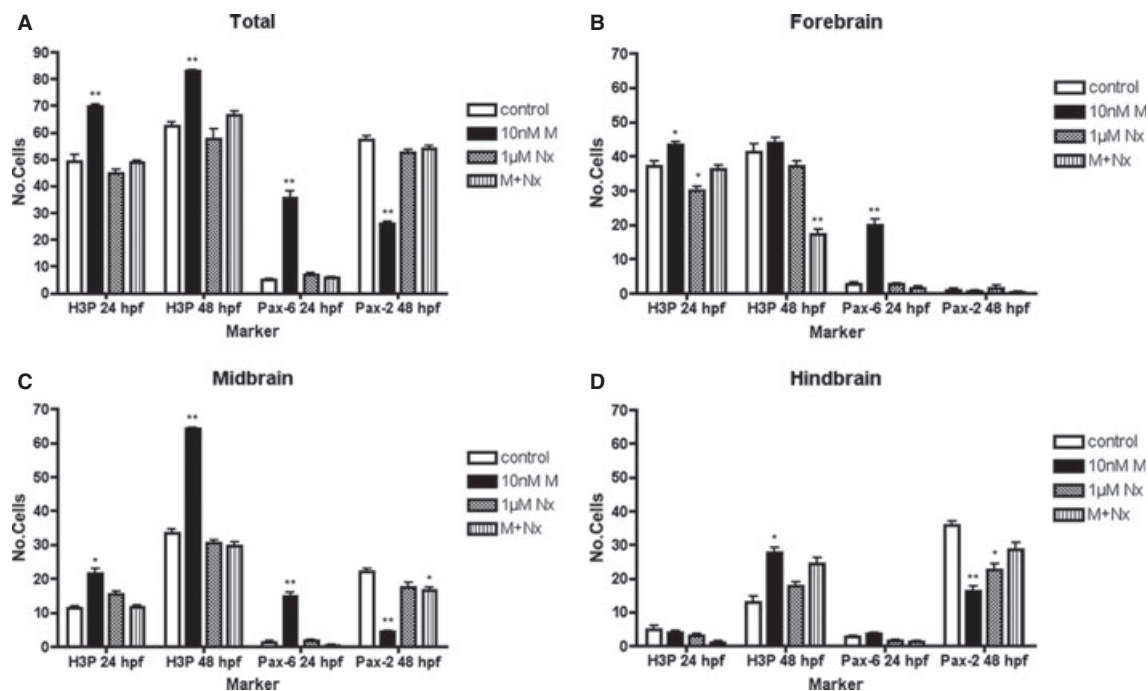


FIG. 3. Quantification of the number of proliferative cells and differentiated neurons in 24- and 48-hpf embryos. (A) Number of proliferative cells in the whole encephalon of 24- and 48-hpf control embryos and number of Pax-6- and Pax-2-positive neurons of 24- and 48-hpf control embryos, exposed to morphine, exposed to naloxone and exposed simultaneously to morphine and naloxone. (B) Number of proliferative cells in forebrain of 24- and 48-hpf control embryos and number of Pax-6- and Pax-2-positive neurons of 24- and 48-hpf control embryos, exposed to morphine, exposed to naloxone and exposed simultaneously to morphine and naloxone. (C) Number of proliferative cells in midbrain of 24- and 48-hpf control embryos and number of Pax-6- and Pax-2-positive neurons of 24- and 48-hpf control embryos, exposed to morphine, exposed to naloxone and exposed simultaneously to morphine and naloxone. (D) Number of proliferative cells in hindbrain of 24- and 48-hpf control embryos and number of Pax-6- and Pax-2-positive neurons of 24- and 48-hpf control embryos, exposed to morphine, exposed to naloxone and exposed simultaneously to morphine and naloxone. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$ (unpaired Student's *t*-test with Welch correction). M, morphine; Nx, naloxone.

control 24-hpf embryos, *ZfDOR1* was detected at lower levels than *ZfDOR2* ($102\ 100 \pm 9287$ vs. $806\ 728 \pm 78\ 654$). When 24-hpf embryos were exposed to morphine or naloxone, the number of *ZfDOR1* transcripts was significantly increased as compared with the control group ($272\ 300 \pm 37\ 140$ and $102\ 100 \pm 9287$ respectively), presenting similar gene expression levels in morphine-exposed embryos and naloxone-exposed embryos. Regarding *ZfDOR2*, although morphine decreased *ZfDOR2* gene expression level almost four-fold compared with the control group, naloxone did not display any significant effect in the transcription of *ZfDOR2* (Fig. 5C–E). As observed in the *ZfMOR* gene expression profile (Fig. 5A and B) the most significant increase in the expression of both delta duplicates at 24 hpf was detected when embryos were exposed to naloxone + morphine (Fig. 5C–E). On the other hand, at the 48-hpf stage, expression of *ZfDOR1* was significantly diminished when embryos were exposed to morphine as compared with the control group (Fig. 5D). This level of transcription was maintained when these embryos were treated with naloxone and naloxone + morphine (Fig. 5D). In contrast, the expression level of *ZfDOR2* was significantly reduced in the morphine-exposed embryos at 48 hpf (Fig. 5F), whereas it returned to the gene expression level observed in the control group when naloxone was administered by itself and also when embryos were exposed to naloxone + morphine.

The zebrafish κ -opioid receptor, *ZfKOR* (Alvarez *et al.*, 2006; GenBank accession no.: NM_182886), exhibits a different gene expression profile than the other three opioid receptors. Its embryonic expression is detected at very low levels (Macho Sanchez-Simon & Rodriguez, 2008). After morphine exposure, *ZfKOR* gene expression significantly increased in both 24- and 48-hpf embryos, an effect inhibited by naloxone (Fig. 5G and H).

Discussion

This study using zebrafish embryos shows that morphine induces cell proliferation (H3P+) at two different developmental stages, 24 and 48 hpf. Also, morphine enhances neuronal differentiation at 24 hpf in certain neuronal populations such as motor neurons (calretinin+) or Pax-6-positive neurons. On the other hand, morphine decreases the number of Pax-2-positive neurons in 48-hpf embryos. In addition, morphine exerts a neuroprotective role against glutamate toxicity. Our *in vivo* results not only show for the first time the influence of morphine on these processes, but also that the changes induced by morphine on proliferation, neuroprotection and neuronal differentiation are possibly related to the alteration of the gene expression level of the opioid receptors observed in morphine-treated embryos. In addition, our qPCR results show that naloxone, when added simultaneously with morphine, produces a drastic effect on the expression of *ZfMOR*, *ZfDOR1* and *ZfDOR2*, which appears to be a synergistic effect. This synergy has been already reported in mammals from a behavioural point of view, when analysing analgesia (Levine *et al.*, 1988; Tsai *et al.*, 2008). It is possible that this synergy is also present at a transcriptional level.

The present work might help to solve the controversy that has arisen in relation to the multiple roles that morphine has in the organism. For instance, *in vitro* studies show that at low doses (10^{-14} M) morphine promotes neurite outgrowth and has a neurotrophic role in rat spinal and cortical neurons, but at higher doses (10^{-6} M) it inhibits axon regeneration (Sinatra & Ford, 1979; Brailoiu *et al.*, 2004). These actions are most probably occurring through opioid receptors as opioid receptor antagonists, such as naloxone, inhibit them. In this sense, it has also been demonstrated *in vitro* that low concentrations of

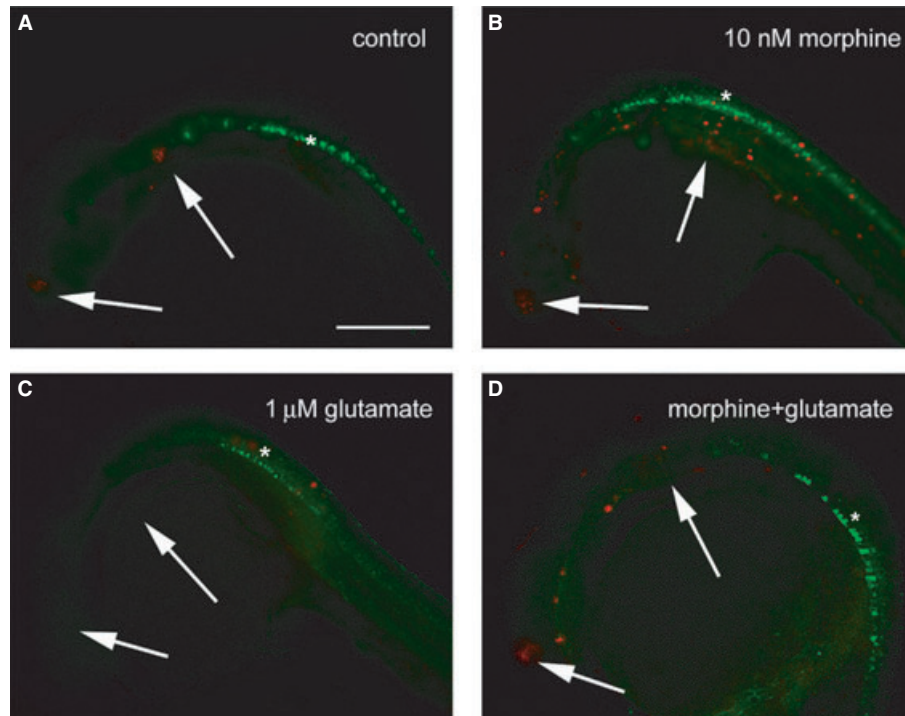


FIG. 4. Neuronal protection against glutamate produced by morphine at 24 hpf. Motor neurons are seen in green and Pax-6-positive in red. (A) Distribution of motor neurons in spinal region (*) and of Pax-6-positive neurons in rostral forebrain and midbrain (arrow) in control embryos. (B) Increase in the number of spinal motor neurons (*) and midbrain Pax-6-positive neurons (arrow) induced by morphine. (C) Glutamate-induced reduction in the number of spinal motor neurons (*) and Pax-6-positive neurons in forebrain (arrow) and midbrain. (D) Morphine-mediated protection of spinal motor neurons (*) and Pax-6-positive neurons in forebrain (arrow) and midbrain against glutamate. Scale bar = 100 μm .

morphine (0.3 μM) induce protection against ischemic damage in rat Purkinje cells via activation of the DOR (Lim *et al.*, 2004). Also, the activation of MOR (the receptor to which morphine displays higher affinity) and KOR favours the differentiation of stem cells into neurons (Persson *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006), and DOR is involved in neuroprotection and neurogenesis (Mayfield *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000; Narita *et al.*, 2006). Both effects are observed when primary neuronal cultures (obtained from mice embryos) are exposed to different delta agonists, such as DPDPE, and they are inhibited by the DOR antagonist naltrindole. More recent studies point to the possibility that the MOR might share with the DOR a role in cell proliferation (Sargeant *et al.*, 2007). These studies have also been done *in vitro*, which leaves unanswered the questions on the real *in vivo* effects of morphine in the organism.

The significant increase in proliferation (H3P+) that we observe (Fig. 2C) in 24-hpf embryos exposed to 10 nM morphine, as well as the increase in the number of motor neurons (calretinin) in the spinal region (Fig. 4D) might, on the one hand, be the cause for the hypertonia and motor disorders found by Kayemba-Kay & Laclayde (2003) in children exposed to opiates, given that hypertonia is produced by an increase in the number of neuromuscular synapses (as more motor neurons are present, the probability of establishing a synapse between muscle cells and motor neurons is higher). On the other hand, it is known that morphine enhances spinal regeneration (Zeng *et al.*, 2007) and in this sense our results open a door to a possible mechanism, i.e. by increasing the number of motor neurons capable of producing neuromuscular synapses.

In addition, the present work shows that morphine prevents *in vivo* the loss of motor neurons and Pax-6-positive neurons in 24-hpf embryos exposed simultaneously to glutamate (a proven neurotoxic

substance) and morphine. Although *in vitro* studies have demonstrated that activation of the opioid receptors, mainly the delta opioid receptor, promote neuroprotection (Narita *et al.*, 2006), we show for the first time *in vivo* that the opioid system is involved in neuronal survival against toxic damage. These results and the fact that at 24 hpf morphine significantly increases the gene expression of *ZfDOR1* (Fig. 5C) but, by contrast, decreases the gene expression of *ZfDOR2*, indicate that the effects of morphine take place through the DOR1 from zebrafish. This hypothesis is also supported by the results we have obtained in 48-hpf embryos: morphine produces a decrease in the gene expression of *ZfDOR1*, but an increase in *ZfDOR2* expression. In parallel, morphine produces a significant increase in cell proliferation (H3P+) as well as a decrease in the number of differentiated neurons (Pax-2+) in both midbrain and hindbrain (Figs 2D and 3), which suggests that although the activation of both delta opioid receptors might increase the cell proliferation rate, *ZfDOR1* enhances neuronal differentiation whereas *ZfDOR2* diminishes it. The differences in the effect of morphine on the gene expression of both delta duplicates can be explained by the differences in binding affinity they display, morphine being a better displacer at *ZfDOR1* ($K_i = 223 \text{ nM}$) than at *ZfDOR2* ($K_i = 1427.67 \pm 302.44 \text{ nM}$; Pinal-Seoane *et al.*, 2006). Their gene expression profile throughout development is also different, suggesting that these duplicates have different functions in development (Macho Sanchez-Simon & Rodriguez, 2008). Furthermore, each delta opioid receptor might regulate the expression of the other in the presence of an agonist, taking into consideration that morphine increases the level of *ZfDOR1* expression when it decreases the level of *ZfDOR2* and vice versa.

In vitro studies point to a possible interaction between the mu and the delta opioid receptors (Gendron *et al.*, 2007; Rozenfeld & Devi,

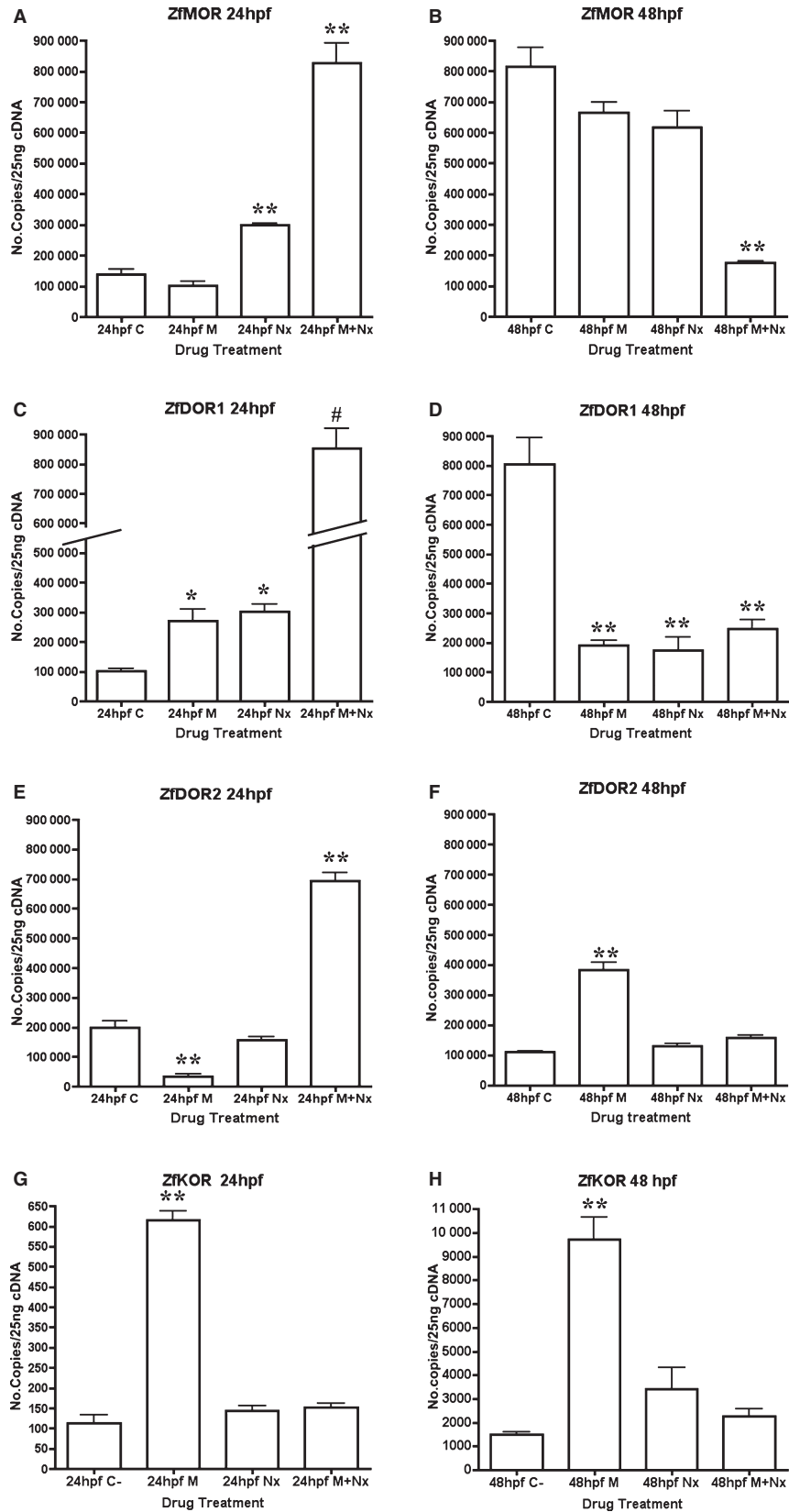


FIG. 5. Effect of morphine in the transcription level of the four opioid receptors from zebrafish. Morphine (M) does not significantly affect the expression of ZfMOR at either 24 or 48 hpf (A and B). Exposure to morphine increases the gene expression of ZfDOR1 at 24 hpf (C) and decreases it at 48 hpf (D). By contrast, morphine reduces the number of ZfDOR2 transcripts at 24 hpf (E) and enhances it at 48 hpf (F). ZfKOR expression significantly increases when embryos are exposed to morphine at 24 hpf (G) and 48 hpf (H), an effect that in this case is inhibited by naloxone (Nx) at both stages. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$ (unpaired Student's *t*-test with Welch correction). #: $2\,607\,000 \pm 45\,400$ copies.

2007; Walwyn *et al.*, 2009). As our results prove that morphine does not alter *ZfMOR* transcription (the zebrafish opioid receptor that shows higher binding affinity towards morphine, $K_i = 0.52$ nM; Marron Fdez. de Velasco *et al.*, 2009) but, at the same time, that this opioid agonist changes the expression of the zebrafish delta opioid receptor duplicates when neither display good affinity towards morphine, it is possible that the interaction between the mu and delta opioid receptors might also occur in the zebrafish, where *ZfMOR*, *ZfDOR1* and *ZfDOR2* are expressed in the same anatomical regions in 24- and 48-hpf embryos (Macho Sanchez-Simon & Rodriguez, 2008). As *ZfMOR* is the only opioid receptor that binds morphine with good affinity (Marron Fdez. de Velasco *et al.*, 2009), this opioid agonist might be acting through an intracellular mechanism that includes interactions between *ZfMOR* and each delta duplicate.

The KOR, as with the MOR, promotes cell proliferation (Kim *et al.*, 2006), although its gene expression in zebrafish development is 1000 times lower than the gene expression of the other opioid receptors (Macho Sanchez-Simon & Rodriguez, 2008), suggesting the possibility that this receptor plays a less important role in development. Indeed, previous studies from our group show that *ZfKOR* displays low affinity to morphine ($K_i = 503$ nM; Alvarez *et al.*, 2006). However, we show here the important changes induced by morphine in *ZfKOR* gene expression levels at 24 and 48 hpf (Fig. 5G and H). The significant upregulation of *ZfKOR* transcription level induced by morphine is inhibited by naloxone, which returns *ZfKOR* expression to control levels at both stages. The changes in *ZfKOR* gene expression levels in morphine-exposed embryos, in the absence of binding affinity towards morphine, suggests that there might also be an interaction between mu and kappa opioid receptors in zebrafish, which has also been suggested *in vitro* in mammals (Yamada *et al.*, 2006), and this could explain the important influence that morphine has on *ZfKOR* gene expression.

In conclusion, our study using zebrafish embryos as an experimental model demonstrates *in vivo* that morphine is directly involved in embryonic cell proliferation, neuronal protection and neuronal differentiation. We show that morphine has the same effect on cell proliferation (H3P+) in zebrafish embryos as it does on mammalian adults and neonates (reviewed by Sargeant *et al.*, 2008), even though different species have been used in the different studies. Also, morphine enhances neuronal differentiation (Pax-6+) at 24 hpf, when it acts as a neuronal protector, and it decreases neuronal differentiation at 48 hpf (Pax-2+), suggesting different roles of the endogenous opioid system at different times of development. Our work also provides the first evidence that the effects of morphine are linked to a morphine-induced change in the gene expression of its endogenous receptors, the opioid receptors, mainly the delta opioid receptors. In addition, we provide a new tool to study motor diseases and neurodegenerative diseases, as this study shows the effect of morphine on the differentiation of specific neuronal populations, which is the case for motor neurons or Pax-2-positive neurons, involved in hypertonia and dopaminergic system development, respectively.

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Grant no. SAF2007-61581) and the Government of Castilla y León (Grant no. SA0800A5); F.M.S.S. is supported by a grant from Junta de Castilla y León. We thank Dr Cesar Raposo (Mass Spectrometry Service, Faculty of Chemistry, University of Salamanca) for helping in the determination of the amount of morphine that penetrates the embryos (HPLC-MS analyses), and Dr Manuel J. Herrero for helpful comments on the manuscript.

Abbreviations

Ab, antibody; CNS, central nervous system; H3P, phosphorylated histone-3; hpf, hours post fertilization; HPLC-MS, high-performance liquid chromatography-mass spectrometry; LOEC, lowest observed effect concentration; PTU, phenyl-thio-urea; qPCR, quantitative real-time PCR; RIN, RNA integrity number.

References

- Alvarez, F.A., Rodriguez-Martin, I., Gonzalez-Nunez, V., de Velasco, E.M., Gonzalez, S.R. & Rodriguez, R.E. (2006) New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neurosci. Lett.*, **405**, 94–99.
- Barrallo, A., Gonzalez-Sarmiento, R., Porteros, A., Garcia-Isidoro, M. & Rodriguez, R.E. (1998a) Cloning, molecular characterization, and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 544–548.
- Barrallo, A., Malvar, F.G., Gonzalez, R., Rodriguez, R.E. & Traynor, J.R. (1998b) Cloning and characterization of a delta opioid receptor from zebrafish. *Biochem. Soc. Trans.*, **26**, S360.
- Barrallo, A., Gonzalez-Sarmiento, R., Alvar, F. & Rodriguez, R.E. (2000) ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **84**, 1–6.
- Batista, M.F. & Lewis, K.E. (2008) Pax2/8 act redundantly to specify glycinergic and GABAergic fates of multiple spinal interneurons. *Dev. Biol.*, **323**, 88–97.
- Berrios, I., Castro, C. & Kuffler, D.P. (2008) Morphine: axon regeneration, neuroprotection, neurotoxicity, tolerance, and neuropathic pain. *P. R. Health Sci. J.*, **27**, 119–128.
- Brailoiu, E., Hoard, J., Brailoiu, G.C., Chi, M., Godbolde, R. & Dun, N.J. (2004) Ultra low concentrations of morphine increase neurite outgrowth in cultured rat spinal cord and cerebral cortical neurons. *Neurosci. Lett.*, **365**, 10–13.
- Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, **1**, 623–634.
- Dienes-Nagy, A., Rivier, L., Giroud, C., Augsburger, M. & Mangin, P. (1999) Method for quantification of morphine and its 3- and 6- glucuronides, codeine, codeine glucuronide and 6-monoacetylmorphine in human blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for routine analysis in forensic toxicology. *J. Chromatogr. A*, **854**, 109–118.
- Fishman, M.C. (2001) Genomics. Zebrafish – the canonical vertebrate. *Science*, **294**, 1290–1291.
- Gendron, L., Esdaile, M.J., Mennicken, F., Pan, H., O'Donnell, D., Vincent, J.P., Devi, L.A., Cahill, C.M., Stroh, T. & Beaudet, A. (2007) Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin. *Neuroscience*, **144**, 263–274.
- Hauptmann, G. & Gerster, T. (2000) Regulatory gene expression patterns reveal transverse and longitudinal subdivisions of the embryonic zebrafish forebrain. *Mech. Dev.*, **91**, 105–118.
- Hauser, K.F., McLaughlin, P.J. & Zagon, I.S. (1987) Endogenous opioids regulate dendritic growth and spine formation in developing rat brain. *Brain Res.*, **416**, 157–161.
- Huang, M., Huang, T., Xiang, Y., Xie, Z., Chen, Y., Yan, R., Xu, J. & Cheng, L. (2008) Ptf1a, Lbx1 and Pax2 coordinate glycinergic and peptidergic transmitter phenotypes in dorsal spinal inhibitory neurons. *Dev. Biol.*, **322**, 394–405.
- Karlstrom, R.O., Talbot, W.S. & Schier, A.F. (1999) Comparative syntenic cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target gli2 affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev.*, **13**, 388–393.
- Kayemba-Kay, S. & Laclayde, J.P. (2003) Buprenorphine withdrawal syndrome in newborns: a report of 13 cases. *Addiction*, **98**, 1599–1604.
- Kim, E., Clark, A.L., Kiss, A., Hahn, J.W., Wesselschmidt, R., Coscia, C.J. & Belcheva, M.M. (2006) Mu- and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors. *J. Biol. Chem.*, **281**, 33749–33760.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, **203**, 253–310.
- Korostynski, M., Piechota, M., Kaminska, D., Solecki, W. & Przewlocki, R. (2007) Morphine effects on striatal transcriptome in mice. *Genome Biol.*, **8**, R128.
- Levanti, M.B., Montalbano, G., Laurà, R., Ciriaco, E., Cobo, T., Garcia-Suarez, O., Germanà, A. & Vega, J.A. (2008) Calretinin in the peripheral nervous system of the adult zebrafish. *J. Anat.*, **212**, 67–71.

- Levine, J.D., Gordon, N.C., Taiwo, Y.O. & Coderre, T.J. (1988) Potentiation of pentazocine analgesia by low-dose naloxone. *J. Clin. Invest.*, **82**, 1574–1577.
- Li Song, D. & Joyner, A.L. (2000) Two Pax2/5/8-binding sites in Engrailed2 are required for proper initiation of endogenous mid-hindbrain expression. *Mech. Dev.*, **90**, 155–165.
- Lim, Y.J., Zheng, S. & Zuo, Z. (2004) Morphine preconditions Purkinje cells against cell death under in vitro simulated ischemia-reperfusion conditions. *Anesthesiology*, **100**, 562–568.
- Macdonald, R., Xu, Q., Barth, A., Mikkola, I., Holder, N., Fjose, A., Krauss, S. & Wilson, S.W. (1994) Regulatory expression boundaries demarcate sites of neuronal differentiation in the embryonic zebrafish forebrain. *Neuron*, **13**, 1039–1053.
- Macho Sanchez-Simon, F. & Rodriguez, R.E. (2008) Developmental expression and distribution of opioid receptors in zebrafish. *Neuroscience*, **151**, 129–137.
- Mao, J. & Mayer, D.J. (2001) Spinal cord neuroplasticity following repeated opioid exposure and its relation to pathological pain. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **933**, 175–184.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. & Gruss, P. (2001) Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell*, **105**, 43–55.
- Marron Fdez. de Velasco, E.M., Law, P.Y. & Rodriguez, R.E. (2009) Mu opioid receptor from the zebrafish exhibits functional characteristics as those of mammalian mu opioid receptor. *Zebrafish*, **6**, 259–268.
- Mayfield, K.P., Kozak, W., Malvin, G.M. & Porreca, F. (1996) Hypoxia decreases opioid delta receptor expression in mouse brain. *Neuroscience*, **72**, 785–789.
- Narita, M., Kishimoto, Y., Ise, Y., Yajima, Y., Misawa, K. & Suzuki, T. (2005) Direct evidence for the involvement of the mesolimbic kappa-opioid system in the morphine-induced rewarding effect under an inflammatory pain-like state. *Neuropsychopharmacology*, **30**, 111–118.
- Narita, M., Kuzumaki, N., Miyatake, M., Sato, F., Wachi, H., Seyama, Y. & Suzuki, T. (2006) Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J. Neurochem.*, **97**, 1494–1505.
- Paquette, J. & Olmstead, M. (2005) Ultra-low dose naltrexone enhances cannabinoid-induced antinociception. *Behav. Pharmacol.*, **16**, 597–603.
- Persson, A.I., Thorlin, T., Bull, C. & Eriksson, P.S. (2003) Opioid induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors. *Mol. Cell. Neurosci.*, **23**, 360–372.
- Pfeffer, P.L., Gerster, T., Lun, K., Brand, M. & Busslinger, M. (1998) Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function. *Development*, **125**, 3063–3074.
- Pinal-Seoane, N., Martin, I.R., Gonzalez-Nunez, V., de Velasco, E.M., Alvarez, F.A., Sarmiento, R.G. & Rodriguez, R.E. (2006) Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish. *J. Mol. Endocrinol.*, **37**, 391–403.
- Rai, K., Nadauld, L.D., Chidester, S., Manos, E.J., James, S.R., Karpf, A.R., Cairns, B.R. & Jones, D.A. (2006) Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 7077–7085.
- Riley, B.B., Chiang, M.Y., Farmer, L. & Heck, R. (1999) The deltaA gene of zebrafish mediates lateral inhibition of hair cells in the inner ear and is regulated by pax2.1. *Development*, **126**, 5669–5678.
- Rozenfeld, R. & Devi, L.A. (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J.*, **21**, 2455–2465.
- Sargeant, T.J., Day, D.J., Mrkusich, E.M., Foo, D.F. & Miller, J.H. (2007) Mu opioid receptors are expressed on radial glia but not migrating neuroblasts in the late embryonic mouse brain. *Brain Res.*, **1175**, 28–38.
- Sargeant, T.J., Miller, J.H. & Day, D.J. (2008) Opioidergic regulation of astroglial/neuronal proliferation: where are we now? *J. Neurochem.*, **107**, 883–897.
- Sinatra, R.S. & Ford, D.H. (1979) The effects of acute and chronic morphine treatment on the process of facial nerve regeneration. *Brain Res.*, **175**, 315–325.
- Spencer-Dene, B., Thorogood, P., Nair, S., Kenny, A.J., Harris, M. & Henderson, B. (1994) Distribution of, and a putative role for, the cell-surface neutral metallo-endopeptidases during mammalian craniofacial development. *Development*, **120**, 3213–3226.
- Trede, N.S., Langenau, D.M., Traver, D., Look, A.T. & Zon, L.I. (2004) The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*, **20**, 367–379.
- Tsai, R.Y., Jang, F.L., Tai, Y.H., Lin, S.L., Shen, C.H. & Wong, C.S. (2008) Ultra-low dose naloxone restores the antinociceptive effect of morphine and suppresses spinal neuroinflammation in PTX-treated rats. *Neuropsychopharmacology*, **33**, 2772–2782.
- Waldhoer, M., Bartlett, S.E. & Whistler, J. (2004) Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 953–990.
- Walwyn, W., John, S., Maga, M., Evans, C.J. & Hales, T.G. (2009) Delta receptors are required for full inhibitory coupling of mu-receptors to voltage-dependent Ca(2+) channels in dorsal root ganglion neurons. *Mol. Pharmacol.*, **76**, 134–143.
- Wardle, F.C., Odom, D.T., Bell, G.W., Yuan, B., Danford, T.W., Wietlette, E.L., Herbolzheimer, E., Sive, H.L., Young, R.A. & Smith, J.C. (2006) Zebrafish promoter microarrays identify actively transcribed embryonic genes. *Genome Biol.*, **7**, R71.
- Weber, T., Corbett, M.K., Chow, L.M., Valentine, M.B., Baker, S.J. & Zuo, J. (2008) Rapid cell-cycle reentry and cell death after acute inactivation of the retinoblastoma gene product in postnatal cochlear hair cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 781–785.
- Yamada, H., Shimoyama, N., Sora, I., Uhl, G.R., Fukuda, Y., Moriya, H. & Shimoyama, M. (2006) Morphine can produce analgesia via spinal kappa opioid receptors in the absence of mu opioid receptors. *Brain Res.*, **1083**, 61–69.
- Zeng, Y.S., Nie, J.H., Zhang, W., Chen, S.J. & Wu, W. (2007) Morphine acts via mu-opioid receptors to enhance spinal regeneration and synaptic reconstruction of primary afferent fibers injured by sciatic nerve crush. *Brain Res.*, **1130**, 108–113.
- Zhang, J., Haddad, G.G. & Xia, Y. (2000) delta-, but not mu- and kappa-, opioid receptor activation protects neocortical neurons from glutamate-induced excitotoxic injury. *Brain Res.*, **885**, 143–153.

4. Sanchez-Simon FM, Zhang XX, Loh HH, Law PY, Rodriguez RE. (2010) Morphine regulates dopaminergic neuron differentiation via miR-133b. *Mol Pharmacol.* 78(5):935-42.

Morphine Regulates Dopaminergic Neuron Differentiation via miR-133b

Fatima Macho Sanchez-Simon, Xiao Xiao Zhang, Horace H. Loh, Ping-Yee Law, and Raquel E. Rodriguez

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Neuroscience, University of Salamanca, Salamanca, Spain (F.M.S.-S., R.E.R.); and Department of Pharmacology, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota (X.X.Z., H.H.L., P.-Y.L.)

Received June 9, 2010; accepted August 17, 2010

ABSTRACT

Morphine is one of the analgesics used most to treat chronic pain, although its long-term administration produces tolerance and dependence through neuronal plasticity. The ability of morphine to regulate neuron differentiation *in vivo* has been reported. However, the detailed mechanisms have not yet been elucidated because of the inability to separate maternal influences from embryonic events. Using zebrafish embryos as the model, we demonstrate that morphine decreases miR-133b expression, hence increasing the expression of its target, Pitx3, a transcription factor that activates tyrosine hydroxylase and dopamine transporter. Using a specific morpholino to knock

down the zebrafish μ -opioid receptor (zfMOR) in the embryos and selective mitogen-activated protein kinase inhibitors, we demonstrate that the morphine-induced miR-133b decrease in zebrafish embryos is mediated by zfMOR activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. A parallel morphine-induced down-regulation of miR-133b was observed in the immature but not in mature rat hippocampal neurons. Our results indicate for the first time that zebrafish embryos express a functional μ -opioid receptor and that zebrafish serves as an excellent model to investigate the roles of microRNA in neuronal development affected by long-term morphine exposure.

Introduction

Opioids are the most potent compounds known to control pain and are also among the most common drugs of abuse (Corbett et al., 2006). They bind to the classic μ - (MOR), δ - (DOR), and κ -opioid receptors. Although great efforts have been made on the study of the different mechanisms that are activated by the opioid system, using mammalian models, many issues regarding opioid regulation remain unknown. The zebrafish (*Danio rerio*) has been used as an experimental model to study not only genetics and development but also disease-related pathways, given its easy *in vivo* manipulation. In this sense, the zebrafish can be an important tool to analyze *in vivo* the molecular mechanisms related to the

activity and function of the opioid system that cannot be fully established in other models. For instance, in contrast to mammalian embryos, which develop in the uterus and are influenced by the maternal biochemical processes, zebrafish embryos develop externally, avoiding the maternal effect on these embryos. This is essential when dealing with drug exposure, because the effects observed in mammalian embryos might be due to the susceptibility of the mother and not the embryo *per se*. The study of the direct effects of morphine in the embryos will provide a better understanding on the molecular mechanisms that underlie the physical and neurobehavioral defects shown in fetuses and offspring after maternal morphine consumption (Nasiraei-Moghadam et al., 2010). In addition, the endogenous opioid system has been characterized in the zebrafish, which has a MOR (zfMOR), two DOR duplicates (zfDOR1 and zfDOR2), a κ -opioid receptor, and an opioid receptor-like (Barrallo et al., 2000; Rodriguez et al., 2000; Alvarez et al., 2006; Pinal-Seoane et al., 2006). The opioid-induced drug addiction pathway has been suggested to involve the midbrain dopaminergic neurons lo-

This work was funded by the Spanish Ministry of Education and Science [Grant SAF2007-61581]; the Regional Government of Castilla y Leon [Grant SA0800A5]; and by the National Institutes of Health National Institute on Drug Abuse [Grants DA007339, DA011806].

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/mol.110.066837.

ABBREVIATIONS: MOR, μ -opioid receptor; DOR, δ -opioid receptor; zfMOR, zebrafish μ -opioid receptor; zfDOR, zebrafish δ -opioid receptor; NAC, nucleus accumbens; miRNA, microRNA; miR, microRNA; CNS, central nervous system; hpf, hours after fertilization; TH, tyrosine hydroxylase; DAT, dopamine transporter; UTR, untranslated region; MO, morpholino; MAPK, mitogen-activated protein kinase; JNK, Jun N-terminal kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; Pitx3, paired-like homeodomain transcription factor 3; SB203580, 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1*H*-imidazole; PD98059, 2'-amino-3'-methoxyflavone; U0126, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(methylthio)butadiene; qRT-PCR, quantitative real-time-polymerase chain reaction.

cated within ventral tegmental area and the nucleus accumbens (NAc). The alteration of dopamine levels in this region produces neuronal sensitization or desensitization, depending on the drug used. It has also been established that morphine increases dopamine level through the MOR in the NAc, which may mediate the reinforcing effects of morphine (Giannelakis, 2009). In relation to these observations, the endogenous opioid peptides, such as enkephalins or dynorphin, are up-regulated in the NAc after exposure to morphine and modulate dopamine release in the midbrain (Gieryk et al.). Therefore, the studies on the probable opioid regulation of dopaminergic activities in zebrafish could provide insights on the mammalian embryonic development during chronic exposure to the drug.

MicroRNAs (miRNAs), a class of ~22-nucleotide RNA molecules, are known to bind to their mRNA targets to inhibit the transcripts translation and/or destabilize them (Valencia-Sanchez et al., 2006). They have been shown to regulate the expression of many genes, including those in the central nervous system (CNS). For example, miR-134 regulates dendritic spine morphology by controlling actin filament dynamics (Schratt et al., 2006), whereas miR-190 regulates NeuroD level, a transcription factor that is known to regulate the differentiation and maturation of neurons (Zheng et al., 2010). Another class of miRNA, miR-133b, regulates the differentiation, maturation, and function of dopaminergic neurons by down-regulating the transcription of its target, the homeobox gene *pitx3* (Hébert and De Strooper, 2009). *Pitx3* activates the transcription of genes directly involved in the differentiation of dopaminergic neurons, genes such as the tyrosine hydroxylase (*th*) and the dopamine transporter (*dat*) (Kim et al., 2007).

In the current study, we analyze the effect of morphine on the miR-133b regulatory pathway using zebrafish embryos, which have been widely used to study the role of miR on development, as a model (Schier and Giraldez, 2006). At 24 h after fertilization (hpf), the dopaminergic system begins its differentiation, and the first TH-positive neurons begin to be detected at this particular developmental stage (Filippi et al., 2007). Our previous studies also indicated that at 24 hpf, there is a robust expression of zfMOR, the putative target of morphine (de Velasco et al., 2009). Therefore, the use of 24 hpf zebrafish embryos not only will provide information on the implication of the opioid system in the maturation and differentiation of dopaminergic neurons compared with any other stages of development but also will demonstrate that the μ -opioid receptor is functional in the zebrafish and has a specific role in the development of the CNS and a possible pathway that leads to addiction.

Materials and Methods

Zebrafish. Zebrafish from the AB strain were bred and raised in the Fish Facilities of the University of Salamanca and the University of Minnesota following standard protocols (Westerfield, 1995). Embryos were separated into two experimental groups for the miRNA microarray: control (untreated) group and embryos exposed to 10 nM morphine. For the analysis of the effects of morphine on the expression of miRNA-133b, *Pitx3*, *TH*, and *DAT*, zebrafish embryos were divided into four experimental groups: control, exposed to 10 nM morphine, exposed to 1 nM morphine, and exposed to 1 μ M naloxone.

miRNA Microarray. Custom miRNA microarray experiments and data analyses were performed as described previously (Kals-

cheuer et al., 2008). Microarray data have been deposited into the Gene Expression Omnibus database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the series GSE18847. Zebrafish embryo samples were prepared in triplicate. The data were normalized against internal control in each chip. The expression of miRNAs in morphine-exposed embryos was compared with those in control embryos. The miRNAs with significant expression change (>125 or <80%; $p < 0.225$ by Student's *t* test) were identified, and the miRNA-133b was chosen for this study, given its implication in addiction.

RNA Extraction and qRT-PCR. Total RNA, including miRNA, was extracted using Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH), following the manufacturer's protocol. NCode miRNA First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used to synthesize cDNA from miRNA and mRNA. cDNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm with a spectrophotometer (SmartSpec Plus; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The absolute quantification of the PCR products was accomplished with a standard curve using the SYBR-Green method. The SYBR-Green was included in a 2 \times Master Mix (QuantiTect SYBR Green PCR Kit; QIAGEN, Valencia, CA). The oligonucleotides used to amplify the different genes studied in this work were as follows: *EF1 α* : forward, GTACTTCTCAGGCTGACTGTG; reverse, ACGATCAGCTGTTTCACTCC. *dre*-miRNA-133b: TTTGGTCCCCTTCAAC-CAGCTA. *zfPitx3*: forward, GACAACAGTGACACAGAGAAGT; reverse, TGTCGGGATAACGGTTTCTC. *zfTH*: forward, TTTGAA-GAGAAGTGCAGAGGAT; reverse, TCAGTAAATCCTGGGTGATCC. *zfDAT*: forward, AGACATCTGGGAAGGTGGTG; reverse, ACCTGAG-CAT CATAACAGGCG. The final volume of each reaction was 20:10 μ l of Master Mix, 0.8 μ l of each oligonucleotide, 7.4 μ l of distilled water, and 1 μ l of cDNA in a concentration of 25 ng/ μ l. A standard curve was constructed for each experiment by serial dilutions of cDNA: 0.1 ng/ μ l, 0.01 ng/ μ l, 0.001 ng/ μ l, and 0.0001 ng/ μ l. The amplification reaction took place in an iCycler System (Bio-Rad Laboratories), with the following conditions: 15 min at 95°C followed by 35 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 57°C, and 30 s at 70°C. PCR was performed three times for each sample per plate, and each experiment was repeated with two different samples. We have used *EF1 α* as an endogenous control.

***Pitx3* 3'UTR Cloning and Microinjection.** QuantiTect SYBR Green PCR Kit from QIAGEN was used to amplify the 3'UTR from *Pitx3* using primers based on the sequence of the full-length cDNA from Ensembl (accession number ENSDARG0000070069). The following primers were used: *zfPitx3* 3'UTR: forward, CGGTATGAAAGC-GATGCGTCTA; reverse, AGACAAAGCAGGCTACACCAGGA. The program used for the amplification was as follows: 15 min at 95°C followed by 35 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 57°C, and 1 min at 70°C. At the end of the cycles, a final extension temperature of 70°C was added for 10 min. The PCR product was purified and cloned into a TOPO-TA 2.1 vector (Invitrogen). TOP 10'F cells (Invitrogen) were transformed with the construct, and a maxi-prep was performed to obtain high quantities of the construct. This construct was digested with EcoRI for 1 h at 37°C and sent for sequencing. The digested product was injected at a concentration of 0.1 ng/ μ l into one-cell zebrafish embryos with a micromanipulator-microinjector system from Eppendorf AG (Hamburg, Germany).

Morpholino Microinjection. The morpholino antisense (MO) oligomer used to knock down *zfMOR* was purchased from Gene Tools, LLC (Philomath, OR), and its sequence was AATGTTGC-CAGTG TTTTCCATCATG. The MO was diluted in sterilized water to a stock concentration of 0.3 mM. In addition to the three MO experimental groups (untreated, 10 nM morphine, and 10 nM morphine plus 1 μ M naloxone), each experiment included a control MO group injected with morpholino that exhibits no binding target or biological activity, as well as a control group (uninjected) for each experimental group (untreated, 10 nM morphine and 10 nM morphine plus 1 μ M naloxone). Zebrafish embryos were injected into the yolk at the one-to-four-cell stage with the morpholino oligonucleotide

according to the published protocols (Nasevicius and Ekker, 2000). Several MO concentrations were used to establish the concentration that produced the greatest effect on the expression level of the studied genes and the lowest embryonic death. To calibrate the amount of solution injected, 10-ms pulses are injected into a 1-l microcapillary (Drummond Scientific, Broomall, PA). The amount of solution in the capillary is measured using a millimeter ruler. These capillaries have 1 μ l of total capacity and are 33 mm long; thus, 1 mm represents 30 nl of solution. The concentrations of *zfmOR* MO and control MO used were 0.2 and 1 μ M, respectively (3 nl were injected into each embryo). Embryos were maintained in E3 medium at 28.5°C until sacrificed at 24 hpf.

Embryonic Treatment with MAPK Inhibitors. Zebrafish embryos were first divided into five experimental groups: control (untreated), exposed to 0.6 μ M JNKII inhibitor, exposed to 60 μ M 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1*H*-imidazole (SB203580; p38 inhibitor), exposed to 50 μ M 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD98059, ERK 1/2 inhibitor), and exposed to 50 μ M 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(methylthio)butadiene (U0126; ERK 1/2 inhibitor). Exposure to the MAPK inhibitors was done after 5 hpf. Because only the ERK 1/2 inhibitors produced the desired effect, different zebrafish embryos were then divided into other experimental groups: control, exposed to PD98059 from 5 to 24 hpf, exposed to PD98059 from 16 to 24 hpf (the exact period in which the CNS is developing and differentiating), exposed to U0126 from 5 to 24 hpf, and exposed to U0126 from 16 to 24 hpf. All embryos were sacrificed at 24 hpf.

Primary Neuronal Culture and RNA Extraction. Hippocampal neurons from P1 rats were isolated and cultured in six-well plates according to previously described protocols (Liao et al., 2007). The 1-week-cultured neurons were divided into four experimental groups: untreated, treated with 100 nM morphine, treated with 1 μ M naloxone, and treated simultaneously with morphine and naloxone. Total RNA (including miRNAs) was isolated using the QIAGEN RNA-easy purification system based on columns. qRT-PCR was performed as described under *RNA Extraction and qRT-PCR* using the same miRNA-133b oligonucleotide that was used with the zebrafish samples, because both species share the same sequence.

Results

Morphine Modulates the Expression of miR-133b.

Using a miRNA array, we observed a decrease in the expression of several miRNAs after embryonic exposure to morphine at three developmental stages: 16, 24, and 48 hpf [array data were deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus database (USA) under the series GSE18847]. Considering the pathways in which each miRNA could be involved, we focused on miR-133b in our studies because of its reported effect on dopaminergic neurons, an essential component in drug addiction process. Our studies were carried out with the 24-hpf embryos, when the differentiation of the zebrafish CNS begins.

To validate our microarray results, qRT-PCR assays were carried out. As shown in Fig. 1A, miR-133b level was decreased in 24-hpf embryos exposed to morphine at two different concentrations, 10 and 1 nM. The antagonist naloxone did not significantly change the expression of this miR, but it could block the morphine effect. Although more selective agonists such as [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin or antagonists such as Cys2-Tyr3-Orn5-Pen7-amide were not used to define the receptor involved because of the lack of affinity of such ligands for *zfmOR* (de Velasco et al., 2009), such morphine effect of miR-133b level was probably mediated by the activation of *zfmOR*.

Morphine Modulates the Expression of miR-133b Targets. One of the miR-133b targets is the transcription factor *Pitx3*. *Pitx3* in turn has been shown to regulate the transcription of *th* and *dat*. Because microRNAs normally regulate the stability or the translation of the transcripts, morphine, by decreasing the miR-133b, should either increase the levels or the activities of these transcripts. As shown in Fig. 1, B to D, treatment of zebrafish embryos with 1 and 10 nM morphine increases the mRNA levels of *pitx3* and *dat*, whereas morphine treatment decreases miR-133b level. However, the level of *th* increases only after treatment

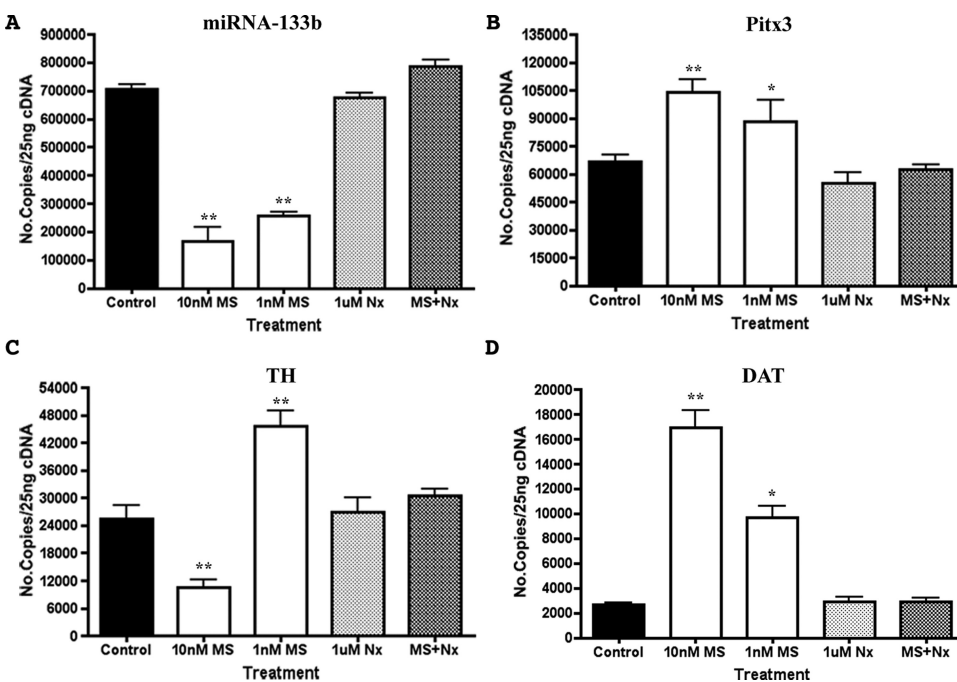


Fig. 1. Effect of morphine on the expression of miRNA-133b, *Pitx3*, TH and DAT. A, qRT-PCR analyses of miRNA-133b levels in 24-hpf zebrafish embryos at two different morphine concentrations, 10 and 1 nM. B, the *Pitx3* levels measured at both concentrations of morphine with qRT-PCR. C, the level of TH transcript measured with qRT-PCR in morphine-exposed embryos. D, the level of DAT transcript measured with qRT-PCR in embryos exposed to morphine. In all cases, the levels of miR-133b and all three transcripts were measured by qRT-PCR in control embryos (no drug exposure), embryos exposed to naloxone only, or embryos exposed to morphine and naloxone. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.005$ (unpaired Student's *t* test with Welch correction), $n = 3$.

with 1 nM morphine, whereas higher concentrations induce a decrease, producing a biphasic effect.

Addition of naloxone effectively abolished the morphine-induced changes in the expression levels of miRNA-133b, *pitx3*, *th*, and *dat* (Fig. 1). These data suggest that morphine regulates the level of the dopaminergic genes via the control of miR-133b by activating zfMOR.

Although treatment of embryos with morphine clearly decreases the miR-133b level and increases the *Pitx3* and its subsequent targets (i.e., TH and DAT levels), whether miR-133b indeed interacts with *Pitx3* thereby destabilizing the transcript has not been demonstrated in zebrafish. Hence, to demonstrate that miR-133b does indeed interact with *Pitx3* and regulates *Pitx3*'s target levels in zebrafish, the 3'UTR sequence of *Pitx3* was amplified and cloned into TOPO-TA pCR 2.1 vector for the injection into one-cell embryos. As shown in Fig. 2A, the embryos injected with the *Pitx3* 3'UTR sequence displayed a decrease in the miR-133b level compared with control embryos (noninjected embryos). At the same time, an increase in the *Pitx3*, TH, and DAT transcript levels were observed in embryos injected with the 3'UTR sequence (Fig. 2, B–D). Thus, the presence of the 3'UTR sequence of *Pitx3*, the putative target of miR-133b, decreased the free miR-133b level in zebrafish embryos resulting in an increase in the expression of *Pitx3* and its subsequent targets.

The Role of zfMOR in Morphine-Induced Regulation of miR-133b Pathway. The effects of morphine in the embryos are probably mediated by zfMOR, the opioid receptor that exhibits highest affinity toward morphine (de Velasco et al., 2009). To establish the role of zfMOR in regulating miR-133b without the availability of a zfMOR-selective antagonist, we decided to silence zfMOR by morpholino oligonucleotide injection. The efficiency of the morpholino oligonucleotide to decrease the zfMOR level was determined with qRT-PCR. Injection of 0.2 μ M morpholino oli-

gonucleotide per embryo reduced the zfMOR transcription level by 95% (the injection of zfMOR decreased the expression of both zfDOR1 and zfDOR2 by approximately 2,5%, which is not statistically significant, showing the specificity of the zfMOR MO; data not shown).

The absence of zfMOR increases the number of miR-133b molecules within the embryos (Fig. 3A). Such an increase was not observed after the injection of a control morpholino. Furthermore, 1 or 10 nM morphine exposure did not alter the miR-133b level in embryos injected with zfMOR morpholino, whereas the same concentrations of morphine treatment resulted in a decrease of miR-133b level in embryos injected with control morpholino (Fig. 3A). The increased expression in miR-133b detected in the zfMOR knockdown embryos also led to a decrease of the subsequent miR-133b targets (i.e., *Pitx3*, TH, and DAT) (Fig. 3, B–D). The morpholino and the opioid antagonist naloxone studies clearly indicate that zfMOR is the mediator for the morphine-induced regulation of miR-133b and its targets.

Morphine-Induced Regulation of the miR-133b Pathway Depends on ERK 1/2 Activity. Morphine via the mammalian MOR regulates multiple signaling pathways. In the rat hippocampus, morphine activates ERK1/2 and decreases the expression level of miR-190 (Zheng et al.). Whether similar signaling mechanism is involved in morphine-induced regulation of the miR-133b pathway in zebrafish is unknown. Hence, several MAPK inhibitors (such as JNK inhibitor II for JNK, SB203580 for p38, and PD98059 and U0126 for ERK1/2 pathways) were used to identify the signals involved in morphine-induced miR-133a regulation. The inhibition of JNK and p38 did produce a significant decrease in the miR-133b level and, hence, an increase in the level of *Pitx3*, TH, and DAT (Table 1). In contrast, the inhibition of MEK1/2 by either U0126 or PD98059 enhanced miR-133b expression; as a consequence, it decreased the level of *Pitx3*, TH, and DAT transcripts (Fig. 4, A–D). Simultaneous exposure to morphine and one of the MEK1/2 inhibitors did not alter the miR-133b level or its

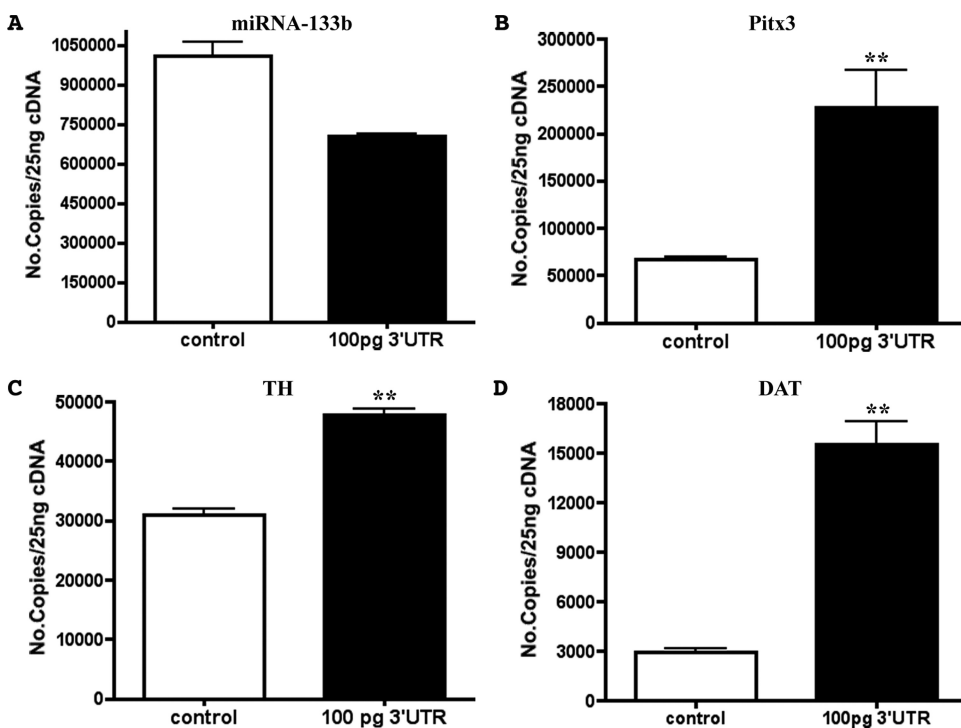


Fig. 2. Effect of the injection of *Pitx3* 3'UTR on the expression of miRNA-133b, *Pitx3*, TH, and DAT. Analyses of the level of miR-133b (A), *Pitx3* (B), TH (C), and DAT (D) by qRT-PCR in 24-hpf zebrafish embryos injected with 100 pg of *Pitx3* 3'UTR. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.005$ (unpaired Student's *t* test with Welch correction), $n = 3$.

related genes' transcript levels compared with embryos that were exposed only to the MEK1/2 inhibitors. Parallel treatment of embryos with morphine in the presence of either JNK or p38 inhibitor did not eliminate the morphine-induced decrease in the miR-133b level (Table 1). Morphine, by activating zMOR morphine via the ERK1/2 pathway, probably regulates the miR-133b level in the zebrafish embryos.

Morphine Regulates miR-133b Expression in Hippocampal Neurons. To determine whether the observed regulation of miR-133b by zMOR in the zebrafish embryos has any mammalian counterparts, hippocampal neurons obtained from P1 rats were treated with 100 nM morphine. Similar to reports from previous studies that used mature hippocampal neuron cultures from mice receiving long-term treatment with morphine, in which microRNA array and qRT-PCR studies revealed no effect on the miR-133b level (10), our current studies with neurons that were mature and differentiated (3-week culture) revealed the absence of morphine or morphine and naloxone effect on the expression of miR-133b (Fig. 5A). In contrast, the level of miR-133b was decreased in 1-week-old neurons

treated with morphine but not with naloxone, an effect that was abolished by the coadministration of morphine and naloxone (Fig. 5B). Thus, similar to what we have observed in the zebrafish embryos, only the miR-133b level within the immature neurons could be affected by the addition of morphine.

Discussion

Opioid receptors are involved not only in endogenous analgesia and development of tolerance, dependence, and addiction but also in certain aspects of the maturation of the CNS, such as neurogenesis or differentiation of neuronal stem cells (Kim et al., 2006). The molecular signals for such opioid activity are being described, but many issues concerning how opioids regulate the maturation of the CNS remain widely unknown, including the interaction between opioids and miRNAs. miRNAs are one of the most important regulatory systems in the organism (Giraldez et al., 2006; Bonauer et al., 2009; Zeng et al., 2009). Their main function is to activate cell proliferation by targeting and therefore

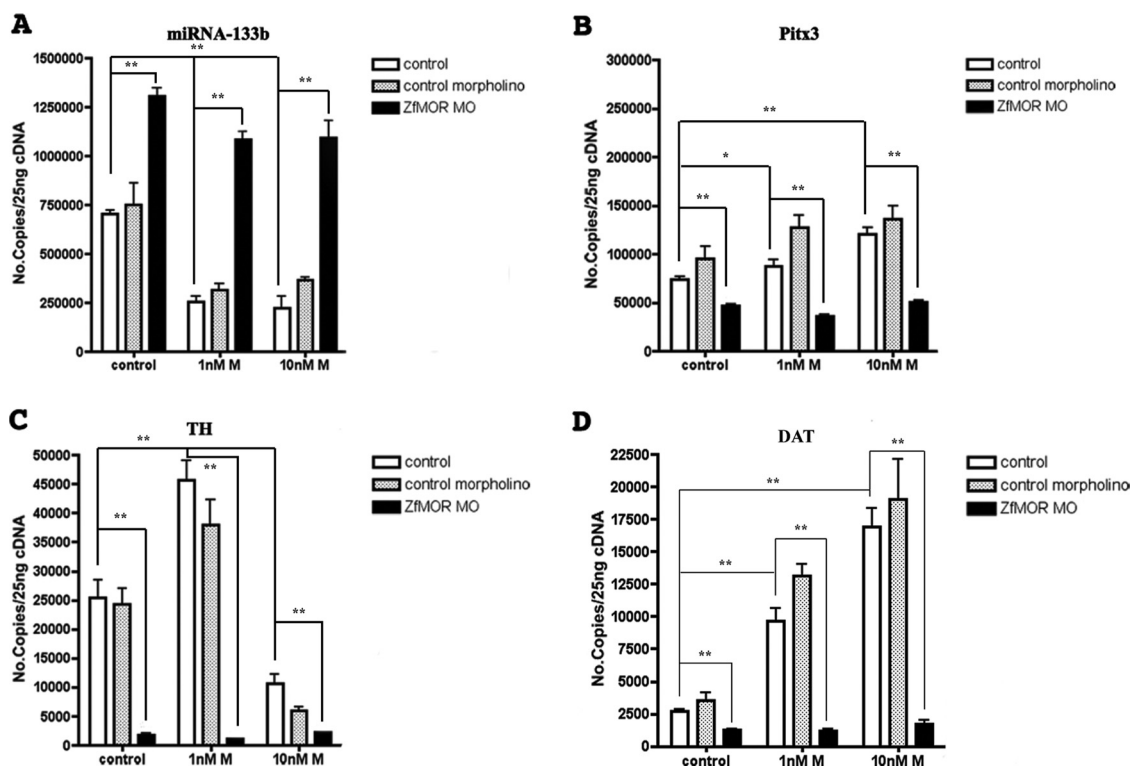


Fig. 3. Effect of MOR knockdown on the expression of miRNA-133b, Pitx3, TH, and DAT. The morpholino oligonucleotide technique was used to knock down the μ -opioid receptor from zebrafish as described under *Materials and Methods*. The consequence of MOR knockdown on the levels of miR-133b (A), Pitx3 (B), TH (C), and DAT (D) in control and 1 or 10 nM morphine-treated embryos were determined by qRT-PCR as described under *Materials and Methods*. Data were analyzed by two-way analysis of variance with post hoc Bonferroni test for comparisons. Error bars, S.E.M.. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.005$, $n = 3$.

TABLE 1

Effect of the inhibition of different MAPK on the level of miRNA-133b, Pitx3, TH, and DAT in zebrafish embryos

Summary of the results obtained by qRT-PCR analysis of miR-133b, Pitx3, TH, and DAT levels in 24-hpf zebrafish embryos exposed to different MAPK inhibitors. The values represent average \pm S.E.M. of the miR and mRNA copy numbers determined as described under *Materials and Methods*.

MAPK Inhibitors	miR-133b	Pitx3	TH	DAT
Control	$7.10 \times 10^5 \pm 10,260$	$66,684 \pm 3537$	$25,465 \pm 3006$	2730 ± 508
JNKII-inhibitor (0.6 μ M)	$1.73 \times 10^5 \pm 9229^{**}$	$1.33 \times 10^5 \pm 5786^{**}$	$50,799 \pm 3031^{**}$	$11,777 \pm 1120^{**}$
SB203580 (60 μ M)	$2.97 \times 10^5 \pm 15,142^{**}$	$1.51 \times 10^5 \pm 7494^{**}$	$52,061 \pm 2575^{**}$	$18,492 \pm 2311^{**}$
PD98059 (50 μ M)	$1.04 \times 10^6 \pm 19,805^*$	$40,060 \pm 2797^*$	$17,546 \pm 771^*$	$1231 \pm 250^*$

* $P \leq 0.05$ (unpaired Student's t test with Welch correction).

** $P \leq 0.005$ (unpaired Student's t test with Welch correction).

promoting the down-regulation of genes involved in differentiation or genes that inhibit proliferation-inducer genes. One of these miRNAs, miR-133b, targets the transcription factor Pitx3, which activates dopaminergic differentiation by up-regulating the expression of genes that are dopaminergic neuron-specific, such as *th* and *dat*, among others (Kim et al., 2007). Similar to the observations in mammals, miR-133b controls *pitx3* transcription by targeting its 3'UTR (Fig. 2) in zebrafish. Taking into consideration the implication of the dopaminergic system in addictive disorders, including addiction to opioid drugs (Flores et al., 2004; Leggio et al., 2009), we have established in this work a pathway that could account for the observed morphine-induced increase in dopamine production (Gianoulakis, 2009). By the modulation of miR-133b regulatory pathways and, hence, dopaminergic differentiation, zfMOR has a specific role in the CNS and is capable of regulating transcription through miRNAs.

In our miRNA arrays screen, morphine regulates multiple miRs (the identities of the miRs regulated have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus database). The

dose-dependent regulation of these miRs is unknown. Furthermore, the agonist concentrations to regulate various signaling pathways are not identical. An excellent example for apparent opposite effect of the drug is reported with neurite growth or regeneration. At lower concentrations, $\sim 10^{-14}$ M, morphine promotes neurite outgrowth and has a neurotrophic role in rat spinal and cortical neurons, but at higher doses, $\sim 10^{-6}$ M, it inhibits axon regeneration (Sinatra and Ford, 1979; Brailoiu et al., 2004). Both actions are antagonized by naloxone, indicative of the involvement of opioid receptor. Although the difference in the morphine doses used in our study is not as obvious, the changes in the transcription of TH induced by 1 and 10 nM morphine could be antagonized by naloxone and so could be blocked by reducing the receptor concentration with specific morpholinos. The TH biphasic responses to these morphine concentrations probably reflect the interactions between myriad of signals and miRs regulated by the opioid receptor expressed in the embryos.

The mammalian μ -opioid receptor activates ERK 1/2

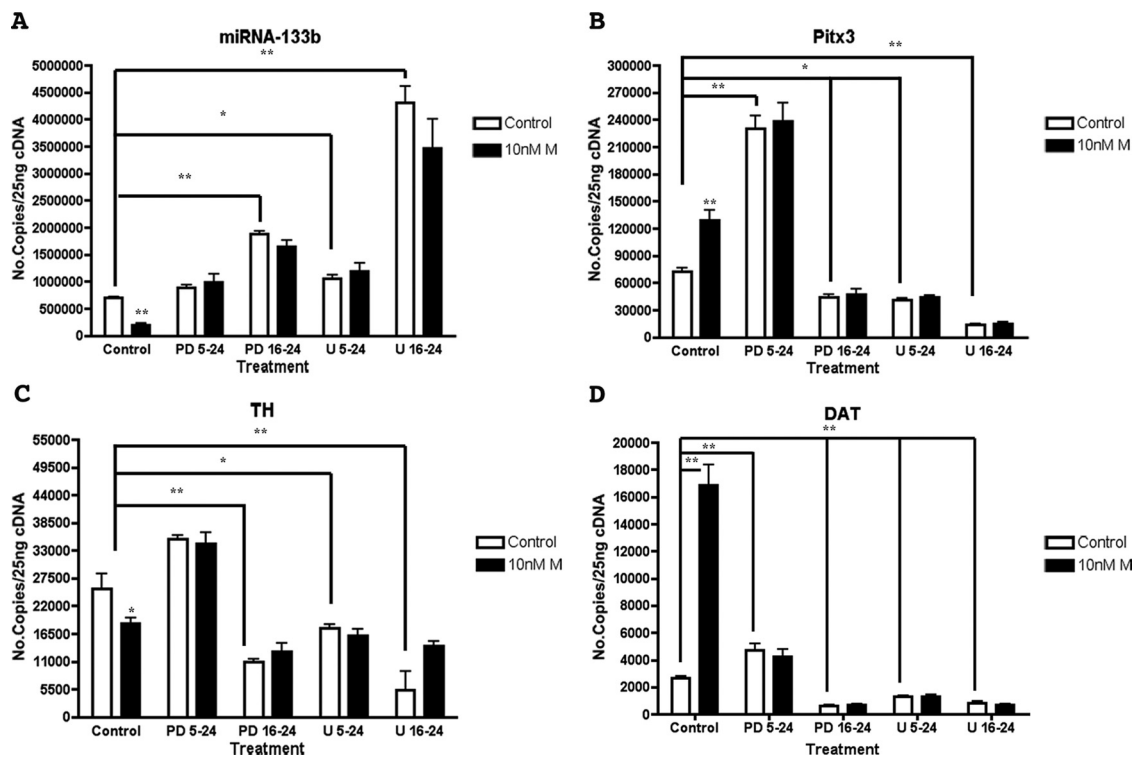


Fig. 4. Effect of the inhibition of ERK 1/2 on the expression of miRNA-133b, Pitx3, TH, and DAT. A, qRT-PCR analyses of miRNA-133b expression levels in 24-hpf zebrafish embryos exposed to the ERK 1/2 inhibitors PD98059 (PD) and U0126 (U) added at 5 or t 16 hpf. B, the *Pitx3* gene expression levels are also measured in the same embryos, as well as *TH* (C) and *DAT* (D). qRT-PCR analyses were also carried out in 24-hpf zebrafish embryos treated simultaneously with 10 nM morphine and ERK 1/2 inhibitors. Data were analyzed by two-way analysis of variance with post hoc Bonferroni test for comparisons. Error bars, S.E.M. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.005$, $n = 3$.

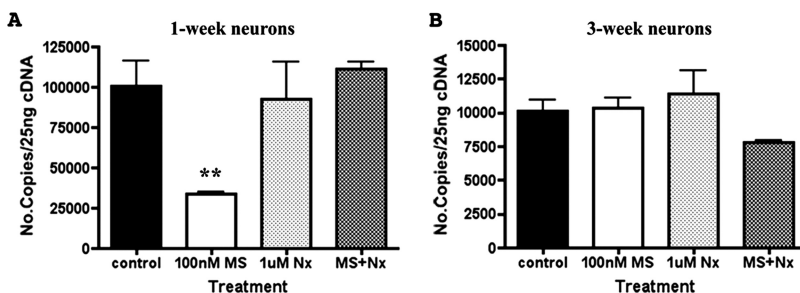


Fig. 5. Effect of morphine on the expression of miRNA-133b in mammalian neurons. The level of miRNA-133b in 1-week (A) and 3-week (B) hippocampal neuron culture treated with 100 nM morphine, 1 μ M naloxone, or morphine and naloxone simultaneously were determined by qRT-PCR. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.005$ (unpaired Student's *t* test with Welch correction), $n = 4$.

(Zheng et al., 2008) and subsequently activates different sets of transcriptional factors leading to the many functions displayed by the receptor, such as proliferation (Persson et al., 2003). In addition, long-term exposure to morphine disrupts ERK 1/2 signaling, which is thought to enhance the development of tolerance. (Macey et al., 2009). Although in zebrafish there is no evidence yet that zMOR induces phosphorylation of ERK 1/2, given the close molecular, pharmacological, and functional homology between mammalian and the zebrafish MOR, we use different MAPK inhibitors to demonstrate that only ERK 1/2 activity was involved in the zMOR regulation of miR-133b and its targets' expression (Fig. 4). As observed in Table 1, the inhibition of other MAPK, such as p38 or JNK, decreased the level of miR-133b, opposite to the inhibition of ERK 1/2, which induced an increase in miR-133b copies. Considering that the absence of the μ -opioid receptor produced an effect similar to that observed after the inhibition of ERK 1/2, these results point out that it is through ERK 1/2 and not the other MAPK that zMOR regulates the differentiation of dopaminergic neurons. Apart from its implication in MOR function (Zhang et al., 2009), phosphorylation by ERK 1/2 is involved in TH activation to synthesize dopamine (Haycock et al., 1992), which is the main step in the differentiation of neuronal precursors to the dopaminergic phenotype. Hence, by inhibiting ERK1/2, dopaminergic differentiation is reduced in two different ways: 1) by attenuating MOR regulation of miR-133b, which leads to a decrease in *pitx3* expression, and 2) by preventing TH phosphorylation. ERK1/2 is also known to be involved in embryogenesis (Krens et al., 2008a,b). Hence, the consequences of maternal morphine intake on the fetus could take place through the intracellular pathways of miR133b and Pitx3. As our results suggest, the neonate abstinence syndrome might be caused by the alteration in dopaminergic differentiation induced by morphine. In addition, the inhibition of ERK 1/2 at two different developmental stages (5 and 16 hpf) have shown that the closer the treatment to the beginning of the differentiation of the CNS, the greater the effect of this inhibition in the expression levels of the genes involved in the maturation and differentiation of dopaminergic neurons. These data point out the importance of the developmental stage at which embryos are exposed to drugs, because exposure at different stages varies the impact of such drugs on embryo development. Thus, the control of miR-133b level could be a possible mechanism responsible for the development of morphine addiction or other drugs of abuse that also increase dopamine levels in the extracellular space. These results show for the first time that the miRNA-133b is a possible new target for the design of new treatments against addictive disorders.

The differences observed on the effect of morphine on the expression of miR-133b in 1- and 3-week-old neurons (Fig. 5) demonstrate that morphine induces differentiation by decreasing the expression of this particular miRNA only in the immature neurons. These results point out that the effects of morphine consumption during pregnancy could reflect the alteration in neuronal differentiation by changes in miR-133b expression. These data also point out that in mammals, morphine has the same effect as in the zebrafish in neuronal differentiation through miR-133b, therefore proving the validity of the zebrafish model to study neurological development during drug treatment.

Acknowledgments

We thank Angel Yuet Fong Kam and Dr. Juan Carlos Arevalo for helpful contribution to the miRNA-133b analysis in mammalian primary neuronal culture. We also acknowledge Dr. Lisa Schimenti and the staff of the University of Minnesota Fish Facility for invaluable help in obtaining zebrafish embryos.

References

- Alvarez FA, Rodríguez-Martin I, Gonzalez-Núñez V, de Velasco EM, Gonzalez Sarmiento R, and Rodríguez RE (2006) New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neurosci Lett* **405**:94–99.
- Barrallo A, González-Sarmiento R, Alvar F, and Rodríguez RE (2000) ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res* **84**:1–6.
- Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, et al. (2009) MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* **324**:1710–1713.
- Brailoiu E, Hoard J, Brailoiu GC, Chi M, Godbolde R, and Dun NJ (2004) Ultra low concentrations of morphine increase neurite outgrowth in cultured rat spinal cord and cerebral cortical neurons. *Neurosci Lett* **365**:10–13.
- Corbett AD, Henderson G, McKnight AT, and Paterson SJ (2006) 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol* **147** (Suppl 1):S153–S162.
- de Velasco EM, Law PY, and Rodríguez RE (2009) Mu opioid receptor from the zebrafish exhibits functional characteristics as those of mammalian mu opioid receptor. *Zebrafish* **6**:259–268.
- Filippi A, Dürr K, Ryu S, Willaredt M, Holzschuh J, and Driever W (2007) Expression and function of *nr4a2*, *lmx1b*, and *pitx3* in zebrafish dopaminergic and noradrenergic neuronal development. *BMC Dev Biol* **7**:135.
- Flores JA, El Banoua F, Galán-Rodríguez B, and Fernández-Espejo E (2004) Opiate anti-nociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D1 (not D2) dopamine receptors. *Pain* **110**: 205–214.
- Gianoulakis C (2009) Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse. *Curr Top Med Chem* **9**:999–1015.
- Gieryk A, Ziolkowska B, Solecki W, Kubik J, and Przewlocki R (2010) Forebrain PENK and PDYN gene expression levels in three inbred strains of mice and their relationship to genotype-dependent morphine reward sensitivity. *Psychopharmacology (Berl)* **208**:291–300.
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, and Schier AF (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**:75–79.
- Haycock JW, Ahn NG, Cobb MH, and Krebs EG (1992) ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:2365–2369.
- Hébert SS and De Strooper B (2009) Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* **32**:199–206.
- Kalscheuer S, Zhang X, Zeng Y, and Upadhyaya P (2008) Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* **29**:2394–2399.
- Kim E, Clark AL, Kiss A, Hahn JW, Wesselschmidt R, Coscia CJ, and Belcheva MM (2006) Mu- and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors. *J Biol Chem* **281**:33749–33760.
- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, and Abelovich A (2007) A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* **317**:1220–1224.
- Krens SF, Corredor-Adamez M, He S, Snaar-Jagalska BE, and Spaink HP (2008a) ERK1 and ERK2 MAPK are key regulators of distinct gene sets in zebrafish embryogenesis. *BMC Genomics* **9**:196.
- Krens SF, He S, Lamers GE, Meijer AH, Bakkers J, Schmidt T, Spaink HP, and Snaar-Jagalska BE (2008b) Distinct functions for ERK1 and ERK2 in cell migration processes during zebrafish gastrulation. *Dev Biol* **319**:370–383.
- Leggio GM, Cathala A, Neny M, Rouge-Pont F, Drago F, Piazza PV, and Spampinato U (2009) In vivo evidence that constitutive activity of serotonin_{2C} receptors in the medial prefrontal cortex participates in the control of dopamine release in the rat nucleus accumbens: differential effects of inverse agonist versus antagonist. *J Neurochem* **111**:614–623.
- Liao D, Grigoriants OO, Wang W, Wiens K, Loh HH, and Law PY (2007) Distinct effects of opioid agonists on the morphology of spines depend upon the internalization of mu opioid receptors. *Mol Cell Neurosci* **35**:456–469.
- Macey TA, Bobeck EN, Hegarty DM, Aicher SA, Ingram SL, and Morgan MM (2009) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation counteracts morphine tolerance in the periaqueductal gray of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **331**:412–418.
- Nasevicius A and Ekker SC (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* **26**:216–220.
- Nasiraei-Moghadam S, Kazeminezhad B, Dargahi L, and Ahmadiani A (2010) Maternal oral consumption of morphine increases Bax/Bcl-2 ratio and caspase 3 activity during early neural system development in rat embryos. *J Mol Neurosci* **41**:156–164.
- Persson AI, Thorlin T, Bull C, and Eriksson PS (2003) Opioid-induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors. *Mol Cell Neurosci* **23**:360–372.
- Pinal-Seoane N, Martin IR, Gonzalez-Núñez V, de Velasco EM, Alvarez FA, Sarmiento RG, and Rodríguez RE (2006) Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish. *J Mol Endocrinol* **37**:391–403.
- Rodríguez RE, Barrallo A, Garcia-Malvar F, McFadyen JJ, Gonzalez-Sarmiento R,

- and Traynor JR (2000) Characterization of ZFOR1, a putative delta-opioid receptor from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett* **288**:207–210.
- Schier AF and Giraldez AJ (2006) MicroRNA function and mechanism: insights from zebra fish. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**:195–203.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, and Greenberg ME (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* **439**:283–289.
- Sinatra RS and Ford DH (1979) The effects of acute and chronic morphine treatment on the process of facial nerve regeneration. *Brain Res* **175**:315–325.
- Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, and Parker R (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* **20**:515–524.
- Westerfield M (1995) *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 3rd ed. University of Oregon, Eugene, OR.
- Zeng L, Carter AD, and Childs SJ (2009) miR-145 directs intestinal maturation in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:17793–17798.
- Zhang Y, Xiong W, Lin X, Ma X, and Yu LC (2009) Receptor trafficking induced by mu-opioid-receptor phosphorylation. *Neurosci Biobehav Rev* **33**:1192–1197.
- Zheng H, Loh HH, and Law PY (2008) Beta-arrestin-dependent mu-opioid receptor-activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) Translocate to Nucleus in Contrast to G protein-dependent ERK activation. *Mol Pharmacol* **73**:178–190.
- Zheng H, Zeng Y, Zhang X, Chu J, Loh HH, and Law PY (2010) mu-Opioid receptor agonists differentially regulate the expression of miR-190 and NeuroD. *Mol Pharmacol* **77**:102–109.

Address correspondence to: Dr. Raquel E. Rodriguez, C/Pintor Fernando Gallego, 1, Lab 13; Salamanca, 37007, Spain. E-mail: requelmi@usal.es

5. Rivas-Boyero AA, Herrero-Turrion MJ, Gonzalez-Nunez V, Sanchez-Simon FM, Barreto-Valer K, Rodriguez RE (2011) Pharmacological characterization of a nociceptin receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Endocrinol*. En prensa.

Pharmacological characterization of a nociceptin receptor from zebrafish (*Danio rerio*)

AUTHOR NAMES: Ángel A. Rivas-Boyero ^{(#), 1}, M. Javier Herrero-Turrión ^{(#), 2}, Veronica Gonzalez-Nunez ^{(#), 1, 2}, Fátima Macho Sánchez-Simón ^{1, 2}, Katherine Barreto-Valer ^{1,2}, and Raquel E. Rodríguez * ^{1,2}.

(#) These authors have equally contributed to this research work.

ADDRESS OF INSTITUTION: ¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, ²Institute of Neurosciences of Castilla y León (INCYL). University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

Correspondence should be addressed to R.E. Rodríguez; Email: requelmi@usal.es

RUNNING TITLE: Characterization of a NOP from zebrafish

KEYWORDS: NOP, nociceptin, pharmacology, kappa opioid receptor, central nervous system, zebrafish.

ABSTRACT

The nociceptin receptor (NOP) and its endogenous ligand, nociceptin/orphanin FQ, are involved in a wide range of biological functions, such as pain, anxiety, learning and memory. The zebrafish has been proposed as a candidate to study the *in vivo* effects of several drugs of abuse and to discover new pharmacological targets. We report the cloning, expression and pharmacological characterization of a NOP receptor from zebrafish (drNOP). The full-length cDNA codes a protein of 363 residues, which shows high sequence similarity to other NOPs. Phylogenetic analysis indicates that NOPs are broadly conserved during vertebrate evolution, and that they stand for the most divergent clade of the opioid/orphanin FQ receptor family. Expression studies have revealed that drNOP mRNA is highly expressed in the central nervous system, and low expression levels are also found in peripheral tissues such as gills, muscle and liver. Pharmacological analysis indicates that drNOP displays specific and saturable binding for [*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin, with a $K_D = 0.20 \pm 0.02$ nM and a $B_{max} = 1703 \pm 81$ fmol/ mg protein. [³H]-Nociceptin binding is displaced by several opioid ligands such as dynorphin A, naloxone, bremazocine or the κ -selective antagonist nor-binaltorphimine. [³⁵S]GTP γ S stimulation studies showed that drNOP receptor is functional, as nociceptin is able to fully activate the receptor and dynorphin A behaves as a partial agonist (50% stimulation). Our results indicate that drNOP receptor displays mixed characteristics of both NOP and κ opioid receptors. Hence, drNOP, which has retained more of the likely ancestral features, bridges the gap between nociceptin and opiate pharmacology.

INTRODUCTION

The opioid receptor-like 1 (ORL1) or nociceptin receptor (NOP) is a G-protein coupled receptor (GPCR) that exhibits a significant degree of sequence identity with the three opioid receptors: μ (MOR), δ (DOR) and κ (KOR) (Waldhoer *et al.* 2004). Despite this sequence similarity, mammalian NOPs display different pharmacological characteristics, since they do not recognize opioid ligands, such as morphine or naloxone (Meunier *et al.* 1995, Reinscheid *et al.* 1995). The endogenous NOP ligand, nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ), is a peptide of 17 residues (Meunier *et al.* 1995) which displays high sequence similarity to dynorphin A (DYN A), the prototypical κ peptide. NOP activation has been associated with numerous biological processes, including spinal analgesia, supraspinal hyperalgesia, inhibition of locomotor activity, anxiolytic-like effects, stress, stimulation of feeding, diuresis, antagonism of opioid-induced effects and depression of the cardiovascular system (Chiou *et al.* 2007, Mogil & Pasternak 2001, Waldhoer *et al.* 2004). Besides, it has been suggested that NOP plays an important role in many complex processes, such as in learning and memory, attention and emotions, movement and motor processes, homeostasis and neuroendocrine secretion (Meunier 1997). Also, expression analysis has revealed that this receptor shows a widespread distribution in both the central (CNS) and the peripheral nervous system (Mollereau & Mouldous 2000).

To date, several *NOP* genes have been cloned and/or identified from different mammalian species (*Homo sapiens*, human (Mollereau *et al.* 1994); *Rattus norvegicus*, rat (Fukuda *et al.* 1994, Lachowicz *et al.* 1995, Nishi *et al.* 1993); *Mus musculus*, mouse (Pan *et al.* 1996); *Mesocricetus auratus*, golden hamster; *Cavia porcellus*, guinea pig; *Sus scrofa*, pig (Osinski *et al.* 1999); *Canis familiaris*, dog; *Equus caballus*, horse; *Monodelphis domestica*, opossum and *Ornithorhynchus anatinus*, platypus), chicken (*Gallus gallus*), from three amphibian species (*Taricha granulosa*, rough-skinned newt (Walthers *et al.* 2005); *Rana pipiens*,

northern leopard frog (Stevens *et al.* 2007) and *Xenopus laevis*, african clawed frog) and chondrosteian *Acipenser transmontanus*, white sturgeon (McClendon *et al.* 2010). However, the existence of a functional NOP in teleosts was still unknown.

Our research group has cloned and characterized the opioid receptors from zebrafish (*Danio rerio*): drDOR1, drDOR2, drMOR and drKOR. Besides, we have also characterized the opioid precursors, namely two proenkephalins, two proopiomelanocortins, a prodynorphin (PDYN) and a pronociceptin (PNOC) [for a complete review of the zebrafish opioid system, please refer to (Gonzalez-Nunez & Rodriguez 2009)]. Interestingly, *drPNOC* codes for two different nociceptin peptides: drNOC (YGGFIGIRKSARKWNNQ) and drNOC-like (FGGFMKGRHGLRKLVSAGRPLQ) (Gonzalez-Nunez *et al.* 2003). The fact that drNOC contains the classical “*opioid message*” -Try-Gly-Gly-Phe- instead of the “*NOP message*” -Phe-Gly-Gly-Phe-, and that the synthetic ligand Tyr-nociceptin binds to NOP as well as to κ and μ opioid receptors (Lapalu *et al.* 1997, Reinscheid *et al.* 1996), led us to think that the zebrafish NOP might show high affinity not only for N/OFQ, but also for opiate ligands, especially for the κ agents. This hypothesis was previously postulated by Danielson *et al.* (2001) in their work with the sturgeon orphanin and by Walthers *et al.* (2005) in the characterization of the nociceptin receptor from the rough-skinned newt.

Additionally, the teleost zebrafish is suitable animal model to study of development and to gain insight into the molecular mechanisms of some human diseases (Lieschke & Currie 2007). Besides, it is possible to conduct chemical screenings to establish the *in vivo* effect of novel chemical agents and to perform toxicological investigations (Zon & Peterson 2005). In addition to this, recent studies have revealed that teleosts are capable of experiencing pain, and a whole issue of the ILAR Journal was dedicated to this topic (*Pain and Distress in Fish* Vol. 50, 2009). On the other hand, the ethical considerations which rise when using the

zebrafish as an alternative model in pain research will stand for a clear advantage as compared to mammalian models.

In the present study we report the cloning, gene expression and pharmacological characterization of a NOP from zebrafish (drNOP). Our results indicate that *NOP* genes have been broadly conserved during the course of vertebrate evolution, although significant changes in their functionality might have occurred.

MATERIALS AND METHODS

Drugs and radioligands

[*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin (82.3 Ci/mmol) was purchased from Perkin-Elmer (Boston MA, USA). Bremazocine (Bre), Naloxone (Nx), nor-Binaltorphimine (nor-BNI) and porcine dynorphin A [1-17] (mammalian, mDYN A) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and nociceptin was purchased from Bachem GmbH (Weil am Rhein, Germany). Zebrafish dynorphin A (drDYN A) was synthesized as trifluoroacetic derivative by G. Arsequell and G. Valencia at the Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona (Spain). All other reagents used were from analytical grade.

Animals

Adult zebrafish were obtained from commercial suppliers and kept in aquaria at 25-28°C with 12 h light/12 h dark periods of light cycle and fed once a day. Fish were anaesthetised with 150 mg L⁻¹ tricaine methanesulfonate (MS-222, Sigma-Aldrich) in tank water and sacrificed by rapid cervical transection. In all experiments, adequate measures were taken to minimize pain or discomfort and animals were handled according to the guidelines of the European Communities Council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and to the current Spanish legislation for the use and care of animals RD 1201/2005 (BOE 252/34367-91, 2005).

Cloning, sequence and phylogenetic analysis

To clone the *drNOP* gene we have followed the standard methodology previously described (Barrallo *et al.* 1998, Pinal-Seoane *et al.* 2006). Oligonucleotides were designed using the Oligo 4.05 Primer Analysis Software (National Biosciences, Inc., Plymouth, Mn, USA), DNA sequences were analyzed with Chromas 2.3[®] (School of Health Science, Griffith University, Australia) software and compared to other nucleotide and/or protein sequence databases using the FASTA or BLAST programmes from EMBL and from the NCBI websites (<http://www.ebi.ac.uk/embl/> and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, respectively). Protein analysis and structure prediction was performed with the SMART server (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

The retrieved DNA and protein sequences were aligned with the ClustalW program, setting all the parameters as default (Thompson *et al.* 1994). The obtained multiple sequence alignments were then used to construct a neighbour-joining (NJ) tree with MEGA4.0.2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software (Tamura *et al.* 2007) to analyze *p*-distance (calculating the proportion of amino acid differences) with the following parameters: complete deletion and considering a bootstrap value of 1000 replicates. The other settings were given as default by the program. The NJ method has a high degree of accuracy and it has been previously used to perform the phylogenetic analysis of *MOR* genes (Herrero-Turrion & Rodriguez 2008).

Quantitative reverse-transcription real-time PCR (RT-qPCR)

Total RNA from whole embryos was extracted using Trizol[®] Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) following the protocol recommended by the manufacturers. cDNA synthesis was carried out by reverse transcription of total RNA to cDNA using the Promega Corporation (Madison, WI, USA) reverse transcription KIT following the manufacturer's protocol. The cDNA samples were then treated with RNase A

(50 ng μL^{-1}) during 10 min at 65° C to avoid RNA contamination of the sample. As cDNA is a DNA-RNA double stranded hybrid, the RNase A does not act on these molecules. The RNase A was then precipitated using 8 μL of 7.5 M ammonium acetate (30 min-incubation at 4°C and spin at 17400 xg for 30 min at 4°C). In order to eliminate the impurities of the sample as a consequence of these treatments, cDNA was precipitated with 0.5 mL cold absolute ethanol (30 min at -20°C). The ethanol was discarded, and the cDNA pellet was eluted in DEPC-treated water.

The quantification of the PCR products was performed using SYBR-Green Power Master Mix (Applied Biosystems Hispania, Alcobendas, Madrid, Spain) as previously described (Sanchez-Simon & Rodriguez 2008). The amplification on *β -actin* on 25 ng of the cDNA used in all the experiments was established as control of cDNA quality. No significant differences were found in the expression of *β -actin* on the different cDNAs from tissues used. The oligonucleotides used to amplify the *NOP* and *β -actin* were: *drNOP_F* 5' ccgtctgtcaccgggtaa 3'; *drNOP_R* 5' aagatgcactc gatgct 3'; *β -actin_F* 5' acgaccagacatcagggag 3'; *β -actin_R* 5' cctctcttgctctgagcctca 3'. The ABI Prism 7300 detection system (Applied Biosystems) was used to amplify *drNOP* and *β -actin*, with the following conditions: 10 min at 95°C followed by 36 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 55°C. Three PCR reactions were performed for each sample per plate, and each experiment was repeated three times.

The absolute quantitation was achieved through a standard curve. A basic PCR was carried out to amplify the fragment of the transcript of interest (either *drNOP* or *β -actin*) on zebrafish cDNA with the same pair of primers that were going to be used in the real time PCR. The fragment was cut from the agarose gel and purified. Serial 1:10 dilutions were made from the purified PCR product, ranging from 10² ng μL^{-1} to 10⁻⁵ ng μL^{-1} . Four out of these 8 points were chosen according to their Ct values, considering that the perfect amplification is

obtained when the difference in the Ct values from one dilution to the next is 3.3, which gives a four-point straight line that has a slope of -3.3. The dilutions used in the standard curve of both genes, *drNOP* and β -*actin*, were: 10^{-1} ng μL^{-1} , 10^{-2} ng μL^{-1} , 10^{-3} ng μL^{-1} and 10^{-4} ng μL^{-1} . The number of copies was calculating as previously described (Sanchez-Simon & Rodriguez 2008).

The RT-qPCR results are expressed as mean \pm SEM. In the analysis of gene expression changes, the mean of transcripts for each tissue was compared to the mean of transcripts of the control tissue (brain) using unpaired Student *t*-test with Welch correction; $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Cell culture and transfection

A 2.6 Kb long *EcoRI-NotI* fragment comprising the complete open reading frame (ORF) of *drNOP* cDNA was excised from the pZiploc plasmid and ligated into the mammalian expression vector pcDNA3[®] (Invitrogene). Human Embryonic Kidney cells (HEK293), obtained from American Type Culture Collection (ATCC CRL-1573) (Manassas, VA, USA) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U mL^{-1} penicillin and 0.1 mg mL^{-1} streptomycin (all from Gibco-BRL Life Technology Inc., Grand Island, NY, USA), at 37°C in humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂ in a Forma incubator. The cell line was transfected with the pcDNA3-*drNOP* plasmid using Transfectam reagent (Promega Corp.) according to the manufacturer's instructions. Geneticin (G418, Gibco-BRL Life Technology) was added to a final concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to obtain cell lines that stably express the *drNOP* transcript. Positive colonies were isolated and tested for *drNOP* mRNA expression by RT-PCR. These colonies were expanded and grown during three months before being used in binding studies.

Membrane preparation

Stably transfected HEK293 cells expressing *drNOP* were grown to 80% confluence, harvested in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 containing 2 mM EDTA and collected by centrifugation at 500 xg. The cell pellets were frozen at -80°C for at least 1 h and resuspended in 50 mM Tris HCl buffer pH 7.4 (assay buffer) with protease inhibitors (0.1 mg mL⁻¹ bacitracin, 3.3 μM captopril and protease inhibitor cocktail, from Sigma-Aldrich). The cell suspensions were homogenized with a Potter-Elvehjem tissue grinder with teflon pestle in assay buffer and the homogenates were centrifuged at 2000 xg for 10 min at 4°C. The nuclear pellet was homogenized again, centrifuged and discarded. The two supernatants were combined, homogenized again with the tissue grinder and the membrane pellet was collected upon centrifugation at 18000 xg for 30 min at 4°C. The crude membrane fraction was resuspended in ice-cold assay buffer with protease inhibitors and protein concentration was determined by Bradford (BioRad Laboratories, Alcobendas, Madrid, Spain).

Saturation binding assays

20-25 μg protein were incubated with different concentrations of the radioligand [*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin for 1 h at 25°C in a final volume of 250 μL of assay buffer with (0.1 mg mL⁻¹) proteinase-free bovine serum albumin (BSA) to avoid the adsorption of the radioligand to the walls of the tubes. 2 μM N/OFQ was used to determine nonspecific binding. After incubation, the reaction was stopped by adding 4 mL of ice-cold 50 mM Tris HCl buffer pH 7.4, the mixture was rapidly filtrated using a Brandel Cell Harvester and washed two times onto GF/B glass-fiber filters that were presoaked with 0.2% (v/v) polyethylenimine for at least 1 h. The filters were placed in scintillation vials and incubated overnight at room temperature in EcoScint A scintillation liquid (London, England). Radioactivity was counted using a Beckman Coulter 6500 scintillation counter (Pasadena, CA). All experiments were performed in triplicate and repeated five times.

Competition binding assays

The following unlabelled ligands were used: N/OFQ (FGGFTGARKSARKLANQ), mammalian(m)DYN A [1-17] (YGGFLRRIRPKLKWDNQ), drDYN A [1-17] (YGGFMRRIRPKLRWDNQ), Nx, Bre and nor-BNI. 20-25 µg protein were incubated with different concentrations of unlabelled ligand ranging from 0.3 nM to 10 µM, and using [*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin as radioligand (the working concentration was similar to the affinity constant, K_D). Reactions were incubated for 1 h at 25°C in a final volume of 250 µL assay buffer with 0.1 mg mL⁻¹ proteinase-free BSA. 10 µM N/OFQ was used to determine nonspecific binding. Experiments were performed as described in "Saturation binding assays". All experiments were performed in triplicate and repeated three times.

[³⁵S]GTPγS stimulation assays

[³⁵S]GTPγS (guanosine-5'-[γ-thio]triphosphate) binding assays were conducted as previously described (Befort *et al.* 1996). Briefly, 20 µg protein were incubated in a 50 mM Tris HCl pH 7.4 buffer with 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1% (v/v) BSA, 10 µM guanosine diphosphate (GDP) and 0.1 nM [³⁵S]GTPγS in the presence of varying concentrations of activating ligands, ranging from 0.1 nM to 10 µM. The following ligands were used: N/OFQ, mDYN A and Bre. Reactions were performed in a final volume of 200 µL for 1 h at 30°C. Non-specific binding was determined with 10 µM unlabelled GTPγS. Bound and free [³⁵S]GTPγS were separated by vacuum filtration through GF/B glass-fiber filters with a Brandell Cell Harvester as described before. Radioactivity was quantified by liquid scintillation counting. All experiments were performed in triplicate and repeated at least three times.

Data analysis

Specific Binding was defined as the difference between total binding and non-specific binding (measured in presence of 2 µM for saturation and 10 µM N/OFQ for competition binding assays, and in presence of 10 µM unlabelled GTPγS for [³⁵S]GTPγS stimulation

assays). Radioligand binding data were analyzed by computer-assisted non linear regression analysis using GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA), and K_D , receptor density (B_{max}), inhibition constant (K_i) and mean effective dose (EC_{50}) were obtained for each ligand. In saturation binding assays, data were fit to either non-linear function and to the linear transformation (Scatchard-plot: Bound/Free vs. Bound). The K_i values were calculated using Cheng and Prusoff's equation, which corrects for the concentration of radioligand used in each experiment as well as for the affinity of the radioligand for its binding site (K_D) (Cheng & Prusoff 1973). In all cases, data were fit to the one-site or two-site binding model, and compared by using the nonlinear least-squares curve-fitting which is based upon a statistical F -test. [35 S]GTP γ S stimulation results were fitted to a sigmoidal dose-response curve using Prism programme.

RESULTS

Molecular characterization of drNOP

A full-length cDNA of 2569 bp, named *drNOP* (GenBank Accession No. AY148348), was cloned (Figure 1). Sequence analysis of this cDNA shows an ORF of 363 residues (predicted molecular weight of 40.87 kDa), which is similar to the length of other NOPs (361-370 amino acids). Protein analysis reveals that drNOP share the common features with other members of the GCPR superfamily (Fig. 1): seven putative transmembrane domains (TM), four consensus sequences for N-glycosylation sites (Asn⁵, Asn²⁰, Asn²⁷ and Asn³²) in the N-terminal extracellular domain, two conserved Cys residues (Cys¹¹⁵ and Cys¹⁹³) that can form a disulfide bond between the first and second extracellular loops (ELs), six putative phosphorylation sites on Ser or Thr residues (Ser²³⁷, Ser²⁴², Ser²⁴⁴ and Thr²⁵⁵ in the third intracellular loop (IL3) and Ser³³⁹ and Thr³⁴⁶ in the C-terminal domain), and two potential palmitoylation sites on Cys residues (Cys³²² and Cys³²⁷) in the C-terminal domain.

Using the BLASTn program in the ENSEMBL web server (<http://www.ensembl.org/>), the chromosomal location of *drNOP* gene was assessed in the Zv9 zebrafish genomic assembly. The *drNOP* gene was mapped to 89039 bp fragment (6024852 to 6113891) in chromosome 23, which comprises the NW_001878401 genomic clone. As also shown in Fig. 1, the *drNOP* gene is formed in 4 exons: the first exon is non coding (227 bp), the second one contains 8 bp of the 5'-untranslated region (UTR) and 209 bp of the coding sequence (Met¹-Arg⁷⁰), the third exon is 358 bp long (Arg⁷⁰-Ser¹⁹⁰) and the fourth exon contains the last 526 bp of the ORF (Ser¹⁹⁰-STOP) and the 1245 bp long 3'-UTR.

Phylogenetic analysis

drNOP protein sequence was aligned to the annotated NOP -orthologues- and opioid (μ , δ , and κ) -paralogues- protein sequences that were retrieved from public databases (Fig. 2). Then, using the NJ method a phylogenetic tree was created from the multiple sequence alignment (Fig. 3). Four major clusters are evident for NOPs, KORs, DORs and MORs, which are supported by bootstrap values of 100%, 100%, 99% and 100%, respectively. In addition to this, no significant differences were found when the trees were constructed with the nucleotide instead of the amino acid sequences (data not shown). Our findings clearly show that *drNOP* is indeed a NOP orthologue.

Expression analysis of *drNOP* mRNA

The *drNOP* gene expression in different tissues from adult zebrafish was analyzed by direct quantification of the number of *drNOP* transcripts using RT-qPCR techniques (Fig. 4). *drNOP* is expressed at high levels in brain, pituitary gland and intestine (more than $\sim 3.5 \times 10^5$ copies per 25 ng cDNA), as compared to gills, muscle and liver (less than $\sim 4 \times 10^4$ copies). Furthermore, low gene expression of *drNOP* was observed in the heart (~ 1300 copies).

Saturation binding assays of [*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin

To determine whether drNOP binds the N/OFQ peptide, the crude membrane fraction of HEK293 cells stably expressing drNOP was used to perform saturation binding assays with [*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin. Non-specific binding was determined in the presence of 2 μM unlabelled N/OFQ. As it can be observed in Fig. 5, radiolabelled N/OFQ displays one single binding site in drNOP with a K_D of 0.20 ± 0.02 nM and a B_{max} of 1703 ± 81 fmol mg⁻¹ protein. The Scatchard transformation also confirms the presence of one single binding site for N/OFQ on this receptor (Fig. 5, inset). As negative control, the crude membrane fraction of untransfected HEK293 cells was tested in saturation binding experiments with [*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin; as expected, no specific binding was observed.

Competition binding assays using opioid ligands on drNOP

Competition binding experiments with [*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin were carried out to establish if opioid ligands were able to bind to drNOP and thus to displace the bound N/OFQ. Non-specific binding was determined in the presence of 10 μM unlabelled N/OFQ. Besides, a homologous displacement with N/OFQ was performed in parallel as positive control. All tested ligands displace [*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin binding, yet with different affinities (Fig. 6), and in all cases, the experimental data fitted better to the one-site displacement model. Interestingly, drDYN A showed higher affinity for drNOP than N/OFQ itself, whereas the mDYN A peptide, the κ-selective antagonist nor-BNI and the non-selective ligand Bre competed efficiently, albeit with reduced affinity when compared to N/OFQ. The affinity of Nx was two rank orders lower than the K_i value obtained for N/OFQ. Besides, Nx leaves some residual [*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin binding that could not be effectively displaced even at the highest concentration (maximal displacement, as determined in the presence of 10 μM Nx of $79.15 \pm 2.75\%$).

GTPγS binding assay

To determine if drNOP is functionally coupled to the heterotrimeric G proteins, [³⁵S]GTPγS stimulation analysis was performed using N/OFQ as well as opioid ligands. As shown in Fig. 7, N/OFQ itself was able to stimulate [³⁵S]GTPγS binding with a EC₅₀ of 87.84 ± 18.61 nM and a percentage of maximal stimulation of 85.69 ± 7.21 %. The opioid ligands mDYN A and Bre show EC₅₀ values on the nanomolar range, but they could only activate G-protein coupling up to 55%, thus behaving as partial agonists.

DISCUSSION

We have cloned and characterized a NOP from zebrafish (drNOP) which displays high degree of sequence identity to other vertebrate NOPs cloned so far: 58-59% sequence identity to mammalian NOPs (Fukuda *et al.* 1994, Lachowicz *et al.* 1995, Mollereau *et al.* 1994, Nishi *et al.* 1993, Osinski *et al.* 1999, Pan *et al.* 1996) and 64% sequence identity to amphibian NOPs (Stevens *et al.* 2007, Walthers *et al.* 2005). On the other hand, the degree of homology to opioid receptors, either from zebrafish (drMOR, drDOR and drKOR) or from other vertebrates, only reaches 50-55%. In general, the highest level of sequence identity between the different NOP and opioid receptors is found at the TMs and ILs, whereas the N-terminus, EL2-3 and the C-terminus are the most divergent (Waldhoer *et al.* 2004).

The number of exons that contain the entire coding region of *drNOP* (3) and their lengths are relatively similar to those described in other vertebrates (Bunzow *et al.* 1994, Chen *et al.* 1994, Fukuda *et al.* 1994, Lachowicz *et al.* 1995, Mollereau *et al.* 1994, Nishi *et al.* 1993, Osinski *et al.* 1999, Pan *et al.* 1996, Stevens *et al.* 2007, Walthers *et al.* 2005, Wang *et al.* 1994, Wick *et al.* 1994), whereas, the introns of *drNOP*, which have variable lengths, are longer than introns of other mammalian *NOPs* (Pan *et al.* 1996).

Using the NJ method a phylogenetic tree was constructed with the aligned amino acid sequences from NOPs and opioid receptors (MORs, DORs and KORs) from different vertebrates (Fig. 3). Somatostatin receptors of zebrafish (drSSTR1a and drSSTR1b), which are paralogues to opioid receptors, were used as outgroups. drNOP is aligned in the same clade as the rest of vertebrate NOPs, hence, this new cDNA/protein corresponds to a NOP orthologue in zebrafish. In particular, NOP sequences are positioned basal to the rest of the clades of opioid receptors, and NOP is the most divergent clade of the opioid/orphanin receptor family.

RT-qPCR gene expression analysis indicates that *drNOP* mRNA is highly expressed in the CNS (brain and pituitary gland). Previous studies have reported the expression of *PNOC* gene in zebrafish brain (Gonzalez-Nunez *et al.* 2003), and high NOP densities in the rat CNS (Mollereau & Mouldous 2000) and in the amphibian (rough-skinned newt) brain (Walthers *et al.* 2005). We also detect high gene expression of *drNOP* in the intestine, which is similar to expression of *NOP* in the rat small intestine (Wang *et al.* 1994). In relation to this, similar results were also reported by Gonzalez-Nunez *et al.* (2003) for *drPNOC*. On the other hand, lower gene expression levels of *drNOP* mRNAs were detected in other peripheral tissues. The presence of drNOP in gills might depict *NOP* expression in the lungs of the tetrapodian rough-skinned newt (Walthers *et al.* 2005) and mammals (Rizzi *et al.* 1999). The fact that low expression levels of *drNOP* mRNA were found in the heart, is in accordance with the existence of high-affinity [³H]N/OFQ-binding sites on rat heart (Dumont & Lemaire 1998). Furthermore, it is the first time that NOP expression has been found in muscle and liver cells, although its role in these organs has not been determined yet.

Binding studies allowed us to determine the pharmacological profile of drNOP. Saturation binding analyses have revealed that [*Leucyl*-3,4,5-³H]-Nociceptin binds to drNOP with relatively high affinity. The affinity constant ($K_D = 0.20 \pm 0.02$ nM) of this single binding site

is in the same range as those reported for mammalian NOPs [K_D = 0.10-0.20 nM; (Butour *et al.* 1997, Hashiba *et al.* 2002, Meng *et al.* 1996, Mollereau *et al.* 1996)] and for the rough-skinned newt NOP [K_D = 0.20 nM; (Walthers *et al.* 2005)]. These results indicate that drNOP affinity for N/OFQ is conserved throughout the evolutionary scale.

Competition binding experiments indicated that [*Leucyl*-3,4,5- 3 H]-Nociceptin binding is displaced by N/OFQ as well as by opioid ligands. Remarkably, the K_i value for drDYN A is lower than the one found for N/OFQ in homologous competition binding assays, thus implying that drDYN A binds to drNOC with higher affinity than N/OFQ itself. mDYN A, Bre and nor-BNI competed efficiently (K_i values on the nanomolar range), whereas Nx showed reduced affinity for drNOC receptor. A prior study has reported that PDYN-derived peptides displayed relatively high affinity for the rough-skinned newt NOP (Walthers *et al.* 2005). In contrast, mDYN A (1-17) showed moderate ability to compete in equilibrium binding of [3 H]-Nociceptin in a crude membrane fraction from Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing the mammalian NOP (Butour *et al.* 1997). However, the combination of four point mutations in the rat NOP yielded a chimeric receptor that binds both N/OFQ and mDYN A (1-17) with subnanomolar affinity (Meng *et al.* 1996).

To determine if drNOP was functional, [35 S]GTP γ S stimulation assay was used to evaluate the effect of different agonists to promote G-protein coupling. All ligands tested were able to activate drNOP, yet with different potencies and maximal effects. N/OFQ behaved as a full agonist, displaying nanomolar EC_{50} values, while opioid ligands could partially activate drNOP, thus acting as partial agonists. In contrast, mDYN A had no effect in inhibiting adenylate cyclase via mammalian NOP (Butour *et al.* 1997), and to date, no functional results have been reported for amphibian NOPs.

The fact that different NOPs share a common binding profile indicates that the binding pocket is highly conserved among the evolutionary scale. Particularly, five residues within

the binding pocket are known to greatly influence ligand affinity: Asp¹³⁰ and Tyr¹³¹ in TM3, Phe²²⁰ and Phe²²⁴ in TM5, and Trp²⁷⁶ in TM6 [human (hs)NOP amino acid numbering (New & Wong 2002)]; these residues are well conserved in drNOP. Furthermore, Asn¹³³ in TM3 and Gln²⁸⁶ in TM6, which play a pivotal role signal transduction (Kam *et al.* 2002, Mouldous *et al.* 2000), are also conserved in drNOP (Fig. 2). Furthermore, the hydrophobic cleft between Gly¹⁸²-Gly¹⁸⁹ in TM4 and Gly²¹²-Ile²¹⁹ (EL2 and TM5), which is located within the transmembrane helix bundle and that interacts with Gly⁶ from N/OFQ [hsNOP amino acid numbering (New & Wong 2002)], is partially conserved in drNOP. However, Gly²¹², which is present in all mammalian NOPs, is replaced by Asp in non-mammalian NOPs (e.g. drNOP, Asp²⁰⁵), KORs, DORs and amphibian MORs, and by Glu in the northern leopard frog NOP (rpNOP) and teleost and mammalian MORs. These amino acid substitution might explain why mammalian NOPs display reduced affinity for DYN A, whereas non-mammalian NOPs are able to bind PDYN-derived peptides with (sub)nanomolar affinities.

The different pharmacological profiles observed for zebrafish and mammalian NOPs could be explained by the existence of amino acid changes in the protein sequences, most of them located in the ELs. Besides, both NOP and KOR discriminate between their corresponding ligands through a general pattern of attractions and repulsions, which is based on the secondary structure of the ELs (Meng *et al.* 1996). The degree of sequence identity at the EL1 between drNOP and mammalian NOP is 87% and between drNOP and mammalian KOR, 46%. Although it seems that EL1 is not directly involved in ligand recognition and/or specificity, EL2 is thought to play a critical role in N/OFQ binding and receptor activation (Mollereau *et al.* 1999, Vincent *et al.* 2008). As shown in Fig. 2, EL2 of drNOP is quite unique, as compared to mammalian NOP and KOR (degree of sequence identity of 36% and 30%, respectively). It has been shown that the negative charges in EL2 are essential for

ligand-receptor interaction (Dooley & Houghten 2000, Reinscheid *et al.* 1996). In this line, although the sequence Glu¹⁹⁴-Asp-Glu-Glu¹⁹⁷ does not have a direct role in agonist binding *per se*, it maintains the mammalian NOP in its active conformation after agonist binding (Mouledous *et al.* 2000). In the case of drNOP, although the degree of sequence identity in EL2 is relatively low, the number of acidic residues is conserved, yet these amino acids are more spread across the EL2 domain. Finally, the degree of sequence identity of EL3 between drNOP and mammalian NOP and KOR is fairly low (35% and 21%, respectively); however, some residues known to play a critical role in receptor activation are conserved among NOPs, as it is the case of Gln²⁸⁶ in mammalian NOP (Gln²⁷⁹ in drNOP) (Fig. 2) (Mouledous *et al.* 2000).

Site-directed mutagenesis studies have yielded receptors with both NOP and KOR characteristics (Meng *et al.* 1996, Meng *et al.* 1998, Mollereau *et al.* 1996). Interestingly, in drNOP and other non-mammalian NOPs, some of the amino acids which are conserved in other NOPs are replaced by prototypical κ residues which are involved in κ -ligand recognition (Table 1). For example, the mutation Thr to Ile in the rat NOP increases the affinity for mDYN A in 20 fold (Meng *et al.* 1996). In this case, non-mammalian NOP contains a Ile in the homologous position (#5 in Table 1 and Fig. 2). Additionally, the four point mutations Val-Gln-Val to Ile-His-Ile (in TM6-EL3) and Thr to Ile (in EL3-TM7) in the rat NOP yielded a dual receptor, as it binds N/OFQ with the same affinity as the wild-type receptor, but it also recognizes opioid ligands (Meng *et al.* 1996). In fact, this mutant receptor displays increased affinity for PDYN κ -selective peptides, and the affinity shown for mDYN A (1-17) is in the subnanomolar range (Meng *et al.* 1996). As shown in Table 1 (#6 in this table and Fig. 2), non-mammalian NOPs also contain Ile-Gln-Ile (in TM6-EL3) and Ile (in EL3-TM7), as expected in an opioid receptor.

The message-address theory states that opioid peptides can be divided into two clearly distinct domains. The “message” would be the common structural moiety, which is located at the N-terminus, namely “Try-Gly-Gly-Phe”; the rest of the peptide would form the “address” (Chavkin & Goldstein 1981). The “message” is where the biological activity of the peptide resides, and hence it binds to the receptor binding pocket. The “address” would interact with different domains of the ELs, thus determining the affinity and selectivity of the ligand for a given receptor (Metzger & Ferguson 1995). Also, it has been suggested that *KOR* and *NOP* derived from the same ancestral gene through a series of duplication and divergence events that run in parallel with the evolution of *PDYN* and *PNOC* genes (McClendon et al. 2010, (Dores *et al.* 2002). (Mollereau *et al.* 1999) postulated that N/OFQ and dynorphin A underwent a coordinated inversion of the “message” and “address” domains, which rendered selective ligands for KOR and NOP. According to this theory, DYN A will exert its activity through a direct interaction of the N-terminal domain with the receptor, whereas it is not the case for N/OFQ. Mollereau et al. (1999) established that the biological activity of N/OFQ resides in the positively charged residues located at the C-terminus, instead of in the hydrophobic N-terminal domain. Therefore, the analysis of the pharmacological profile of NOPs in fishes supports the hypothesis of separate “message”-“address” domains for the opioid and N/OFQ peptides.

Gonzalez-Nunez et al. (2003) reported that one of the N/OFQ peptides from zebrafish, drNOC, is highly similar to mDYN A, and presents the classical “opioid address” (Tyr-Gly-Gly-Phe) at its N-terminus. We hypothesized that drNOC might bind to opioid receptors with high affinity, and that drNOP will recognise and bind opioid ligands with high affinity too. Besides, it has been reported that white sturgeon PNOC-derived peptides are able to bind to the three mammalian opioid receptors (μ , δ , and κ), as well as to mammalian NOP (Danielson *et al.* 2001). Besides, competition binding assays performed with the rough-

skinned newt NOP have revealed that amphibian NOP binds PDYN-derived peptides with broad affinity, although no significant binding was found for other opiate drugs (Walthers *et al.* 2005). The latter result is consistent with the fact that highly-selective ligands for the mammalian opioid receptors (e.g. ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly⁵-ol]-enkephalin) –DAMGO-, D-Penicillamine(2,5)-enkephalin –DPDPE- or [(5 α ,7 α ,8 β)-(+)–N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidinyl)-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl]-benzeneacetamide] –U69,593-) failed to show effective displacement on amphibians and teleosts, such as zebrafish (Gonzalez-Nunez *et al.* 2006). However, less selective ligands, as Bre or Nx, are able to recognise and displace [³H]-nociceptin binding on drNOP, which clearly differs from the published reports for amphibian NOPs (Stevens *et al.* 2007, Walthers *et al.* 2005).

In conclusion, our results clearly show that drNOP recognizes and binds N/OFQ as well as opioid ligands, showing a preference for the κ -selective agents. Hence, drNOP might be a potential evolutionary link between NOP and KOR, and will help to bridge the gap between opiate and NOP pharmacology.

DECLARATIONS OF INTEREST

All authors of manuscript declare that the paper contains no conflict of interest that would prejudice its impartially.

FUNDING

This work was supported in part by grants from Spanish Ministry of Science and Education (SAF2007-61581) and Junta de Castilla y León (SA037A008). Fatima Macho is a predoctoral fellow of Junta de Castilla y León.

ACKNOWLEDGEMENTS.

The authors would like to thank G. Valencia and G. Arsequell for synthesizing the zebrafish dynorphin A peptide.

REFERENCES

Reference List

- Barrallo A, Malvar FG, Gonzalez R, Rodriguez RE & Traynor JR 1998 Cloning and characterization of a delta opioid receptor from zebrafish. *Biochem. Soc. Trans.* **26** S360.
- Befort K, Tabbara L, Kling D, Maigret B & Kieffer BL 1996 Role of aromatic transmembrane residues of the delta-opioid receptor in ligand recognition. *J. Biol. Chem.* **271** 10161-10168.
- Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M & Grandy DK 1994 Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett.* **347** 284-288.
- Butour JL, Moisand C, Mazarguil H, Mollereau C & Meunier JC 1997 Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL 1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids. *Eur. J. Pharmacol.* **321** 97-103.
- Chavkin C & Goldstein A 1981 Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure-activity relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78** 6543-6547.
- Chen Y, Fan Y, Liu J, Mestek A, Tian M, Kozak CA & Yu L 1994 Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett.* **347** 279-283.
- Cheng Y & Prusoff WH 1973 Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22** 3099-3108.

Chiou LC, Liao YY, Fan PC, Kuo PH, Wang CH, Riemer C & Prinssen EP 2007 Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Curr. Drug Targets.* **8** 117-135.

Danielson PB, Hoversten MT, Fitzpatrick M, Schreck C, Akil H & Dores RM 2001 Sturgeon orphanin, a molecular "fossil" that bridges the gap between the opioids and orphanin FQ/nociceptin. *J. Biol. Chem.* **276** 22114-22119.

Dooley CT & Houghten RA 2000 Orphanin FQ/nociceptin receptor binding studies. *Peptides* **21** 949-960.

Dores RM, Lecaude S, Bauer D & Danielson PB 2002 Analyzing the evolution of the opioid/orphanin gene family. *Mass Spectrom. Rev.* **21** 220-243.

Dumont M & Lemaire S 1998 Characterization of the high affinity [³H]nociceptin binding site in membrane preparations of rat heart: correlations with the non-opioid dynorphin binding site. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30** 2751-2760.

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

Gonzalez-Nunez V, Barrallo A, Traynor JR & Rodriguez RE 2006 Characterization of opioid-binding sites in zebrafish brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316** 900-904.

Gonzalez-Nunez V, Gonzalez-Sarmiento R & Rodriguez RE 2003 Cloning and characterization of a full-length pronociceptin in zebrafish: evidence of the existence of two different nociceptin sequences in the same precursor. *Biochim. Biophys. Acta* **1629** 114-118.

Gonzalez-Nunez V & Rodriguez RE 2009 The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. *ILAR. J.* **50** 373-386.

Hashiba E, Lambert DG, Farkas J, Toth G & Smith G 2002 Comparison of the binding of [(3)H]nociceptin/orphaninFQ(1-13)NH(2), [(3)H]nociceptin/orphaninFQ(1-17)OH and [(125)I]Tyr(14)nociceptin/orphaninFQ(1-17)OH to recombinant human and native rat cerebrocortical nociceptin/orphanin FQ receptors. *Neurosci. Lett.* **328** 5-8.

Herrero-Turrion MJ & Rodriguez RE 2008 Bioinformatic analysis of the origin, sequence and diversification of mu opioid receptors in vertebrates. *Mol. Phylogenet. Evol.*

Kam KW, New DC & Wong YH 2002 Constitutive activation of the opioid receptor-like (ORL1) receptor by mutation of Asn133 to tryptophan in the third transmembrane region. *J. Neurochem.* **83** 1461-1470.

Lachowicz JE, Shen Y, Monsma FJ, Jr. & Sibley DR 1995 Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J. Neurochem.* **64** 34-40.

Lapalu S, Moisand C, Mazarguil H, Cambois G, Mollereau C & Meunier JC 1997 Comparison of the structure-activity relationships of nociceptin and dynorphin A using chimeric peptides. *FEBS Lett.* **417** 333-336.

Lieschke GJ & Currie PD 2007 Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* **8** 353-367.

Meng F, Taylor LP, Hoversten MT, Ueda Y, Ardati A, Reinscheid RK, Monsma FJ, Watson SJ, Civelli O & Akil H 1996 Moving from the orphanin FQ receptor to an opioid receptor using four point mutations. *J. Biol. Chem.* **271** 32016-32020.

Meng F, Ueda Y, Hoversten MT, Taylor LP, Reinscheid RK, Monsma FJ, Watson SJ, Civelli O & Akil H 1998 Creating a functional opioid alkaloid binding site in the orphanin FQ receptor through site-directed mutagenesis. *Mol. Pharmacol.* **53** 772-777.

Metzger TG & Ferguson DM 1995 On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Lett.* **375** 1-4.

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

Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B & . 1995 Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* **377** 532-535.

Mogil JS & Pasternak GW 2001 The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. *Pharmacol. Rev.* **53** 381-415.

Mollereau C, Moisand C, Butour JL, Parmentier M & Meunier JC 1996 Replacement of Gln280 by His in TM6 of the human ORL1 receptor increases affinity but reduces intrinsic activity of opioids. *FEBS Lett.* **395** 17-21.

Mollereau C & Mouldous L 2000 Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* **21** 907-917.

Mollereau C, Mouldous L, Lapalu S, Cambois G, Moisand C, Butour JL & Meunier JC 1999 Distinct mechanisms for activation of the opioid receptor-like 1 and kappa-opioid receptors by nociceptin and dynorphin A. *Mol. Pharmacol.* **55** 324-331.

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

Mouledous L, Topham CM, Moisand C, Mollereau C & Meunier JC 2000 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** 495-502.

New DC & Wong YH 2002 The ORL1 receptor: molecular pharmacology and signalling mechanisms. *Neurosignals.* **11** 197-212.

Nishi M, Takeshima H, Fukuda K, Kato S & Mori K 1993 cDNA cloning and pharmacological characterization of an opioid receptor with high affinities for kappa-subtype-selective ligands. *FEBS Lett.* **330** 77-80.

Osinski MA, Pampusch MS, Murtaugh MP & Brown DR 1999 Cloning, expression and functional role of a nociceptin/orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract. *Eur. J. Pharmacol.* **365** 281-289.

Pan YX, Xu J & Pasternak GW 1996 Structure and characterization of the gene encoding a mouse kappa3-related opioid receptor. *Gene* **171** 255-260.

Pinal-Seoane N, Martin IR, Gonzalez-Nunez V, de Velasco EM, Alvarez FA, Sarmiento RG & Rodriguez RE 2006 Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish. *J. Mol. Endocrinol.* **37** 391-403.

Reinscheid RK, Ardati A, Monsma FJ, Jr. & Civelli O 1996 Structure-activity relationship studies on the novel neuropeptide orphanin FQ. *J. Biol. Chem.* **271** 14163-14168.

Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ, Jr. & Civelli O 1995 Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* **270** 792-794.

Rizzi A, Calo G, Trevisani M, Tognetto M, Fabbri L, Mapp C, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D & Geppetti P 1999 Nociceptin receptor activation inhibits tachykinergic non adrenergic non cholinergic contraction of guinea pig isolated bronchus. *Life Sci.* **64** L157-L163.

Sanchez-Simon FM & Rodriguez RE 2008 Developmental expression and distribution of opioid receptors in zebrafish. *Neuroscience* **151** 129-137.

Stevens CW, Brasel CM & Mohan S 2007 Cloning and bioinformatics of amphibian mu, delta, kappa, and nociceptin opioid receptors expressed in brain tissue: Evidence for opioid receptor divergence in mammals. *Neurosci. Lett.* **419** 189-194.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S 2007 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24** 1596-1599.

Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ 1994 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22** 4673-4680.

Vincent B, Mouledous L, Bes B, Mazarguil H, Meunier JC, Milon A & Demange P 2008 Description of the low-affinity interaction between nociceptin and the second extracellular loop of its receptor by fluorescence and NMR spectroscopies. *J. Pept. Sci.* **14** 1183-1194.

Waldhoer M, Bartlett SE & Whistler JL 2004 Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **73** 953-990.

Walthers EA, Bradford CS & Moore FL 2005 Cloning, pharmacological characterization and tissue distribution of an ORL1 opioid receptor from an amphibian, the rough-skinned newt *Taricha granulosa*. *J. Mol. Endocrinol.* **34** 247-256.

Wang JB, Johnson PS, Imai Y, Persico AM, Ozenberger BA, Eppler CM & Uhl GR 1994 cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett.* **348** 75-79.

Wick MJ, Minnerath SR, Lin X, Elde R, Law PY & Loh HH 1994 Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **27** 37-44.

Zon LI & Peterson RT 2005 In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** 35-44.

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Table 1. Amino acid motifs of non-mammalian NOPs which are not conserved in mammalian NOPs and that are replaced by prototypical κ residues (*); interestingly, these residues are involved in κ -ligand recognition. For a better understanding of this table consideration of Fig. 2 is suggested. Moreover, in the analysis of this table it has been also included the amino acid sequence of the white sturgeon NOP (Genebank accession number, GU228526; McCledon et al., 2010). Abbreviations used: TM, transmembrane domain; EL, extracellular loop.

Figure 1. Nucleotide and predicted amino acid sequences of drNOP. Nucleotides are numbered in the 5' to 3' direction and the residues are shown in one-letter code below the nucleotide sequence. The seven transmembrane domains (TM) are single underlined, the exon-intron boundaries are shaded in grey and the oligonucleotide sequences used in RT-qPCR experiments are double underlined. Legend: (*) Ser and (P) Thr phosphorylation sites (4/2); (Y) N-glycosylation sites (4) at the N-terminus; (#) putative palmitoylation sites in Cys at the C-terminus; and (>) disulfide bond between Cys located at the extracellular loops (EL1 and EL2), respectively.

Figure 2. ClustalW Multiple Sequence Alignment of NOP and opioid receptor (KOR, DOR and MOR) sequences. The amino acid sequences from the following species were used: I) Teleosts: zebrafish (drKOR, NM_182886.1; drDOR1, NM_131258.3; drDOR2, NM_212755.1 and drMOR, NM_131707) and *Catostomus commersoni*, white sucker (ccMOR, Y10904). II) Amphibians: *Taricha granulosa*, rough-skinned newt (tgNOP, AY728087; tgKOR, AY725197.1; tgDOR, AY751785.1 and tgMOR, AY751784), *Xenopus laevis*, African clawed frog (xlNOP, AY7244474) and *Rana pipiens*, northern leopard frog

(rpNOP, AY434690; rpKOR, AF530573.2; rpDOR, AF530572.1 and rpMOR, AF530571). III) Birds: *Gallus gallus*, chicken (ggNOP, XM_417424.2; ggKOR, XM_426087.2; ggDOR, XM_427506.2 and ggMOR (Herrero-Turrion & Rodriguez 2008). IV) Mammals: *Rattus norvegicus*, rat (rnNOP, NM_031569.2; rnKOR, NM_017167.2; rnDOR, NM_012617.1 and rnMOR, NM_013071), *Mus musculus*, mouse (mmNOP, AK079529; mmKOR, NM_011011.1; mmDOR, NM_013622.3 and mmMOR, NM_011013) and *Homo sapiens*, human (hsNOP, NM_000913.3; hsKOR, NM_000912.3; hsDOR, NM_000911.3 and hsMOR, NM_000914.2). Transmembrane domains are boxed, and intracellular / extracellular loops and N- / C-terminal domains are also indicated. Legend: ▲ - highly conserved residues in GCPR superfamily; ¥ – NOP residues known to influence ligand binding affinity; Φ - amino acids which are involved in κ-ligand recognition; dots - identical residues to drNOP; dashes - sequence gaps. For further details about the importance of those amino acid residues which are shaded (from #1 up to #6), please refer to Table 1. Abbreviations: TM, transmembrane domain; IL, intracellular loop; EL, extracellular loop.

Figure 3. Phylogenetic analysis generated by the NJ method using MEGA4 (Tamura *et al.* 2007) from the multiple sequence alignment shown in Fig. 2. Whole numbers indicate bootstrap values of 1000 replicates and branch distances are given in decimal numbers when >50%. Two zebrafish somatostatin receptors (drSSTR1a and drSSTR1b, XM_691574 and XM_680740) were used as outgroup.

Figure 4. Absolute quantification of *drNOP* expression by RT-qPCR in adult tissues. Bars (mean ± S.E.M.) represent the number of mRNA copies of *drNOP* mRNA in each adult tissue. Zebrafish *β-actin* was used as housekeeping gene. For each tissue the number of

experiments represented in this graph was between four and six; ** $P \leq 0.005$; *** $P \leq 0.001$ (unpaired Student's *t*-test with Welch correction).

Figure 5. Saturation binding analysis of [*Leucyl*-3,4,5-³H]-nociceptin in membrane homogenates of HEK293 cells stably expressing drNOP. Inset: Scatchard transformation. Data are from a representative experiment that was repeated five times in triplicate.

Figure 6. Competition binding experiments using [*Leucyl*-3,4,5-³H]-nociceptin on drNOP membrane homogenates. Relative abilities of N/OFQ and opioid ligands to compete with equilibrium binding of radiolabelled N/OFQ. Data were fit to the one-site competition model and each point represents the mean \pm S.E.M. (capped bars) of three independent experiments performed in triplicate. The table summarizes the K_i values (Mean \pm SEM, nM) for several ligands obtained from this competition binding assays.

Figure 7. [³⁵S]GTP γ S stimulation assays on drNOP. Relative abilities of nociceptin and opioid ligands to promote G-protein coupling and [³⁵S]GTP γ S binding in crude membrane fraction of HEK293(drNOP). Data points represent the mean \pm S.E.M. (capped bars) of three different experiments performed in duplicate. The table summarizes the EC_{50} values obtained for several ligands obtained from this [³⁵S]-GTP γ S stimulation assays and the percentage of maximal [³⁵S]-GTP γ S stimulation shown at a concentration of 10 μ M of the activating ligand.