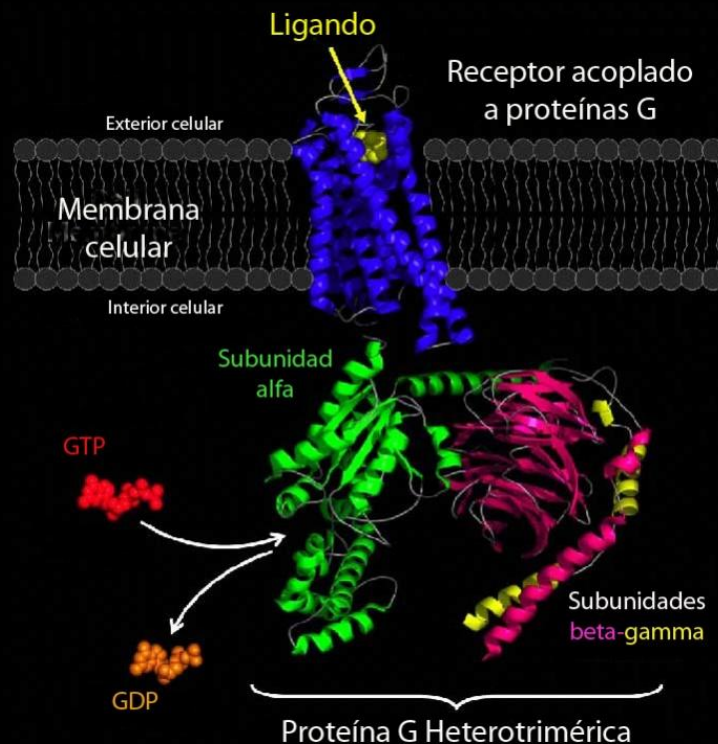


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



NUEVOS ASPECTOS EN LA REGULACIÓN DE
RECEPTORES G EN EL SISTEMA NERVIOSO.
ESTUDIO COMPARATIVO DEL RECEPTOR
OPIOIDE μ Y CANNABINOIDE CB1



ELENA DE LA TORRE MADRID

Madrid, Abril 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**NUEVOS ASPECTOS EN LA REGULACIÓN DE
RECEPTORES G EN EL SISTEMA NERVIOSO.
ESTUDIO COMPARATIVO DEL RECEPTOR
OPIOIDE μ Y CANNABINOIDE CB1**

ELENA DE LA TORRE MADRID

Madrid, Abril 2010

El Dr. Javier Garzón Niño y la Dra. María Rodríguez Muñoz directores del trabajo de Tesis Doctoral con título “Nuevos aspectos de la regulación de receptores G en el Sistema Nervioso. Estudio comparativo del receptor opioide μ y el cannabinoide CB1” realizado por Dña. Elena de la Torre Madrid en el Instituto de Neurobiología Santiago Ramón y Cajal, certifican que este estudio ha aportado los siguientes resultados originales:

- El trabajo realizado con RGS14 ha demostrado que su asociación con el receptor opioide μ limita la acción de quinasas como GRK y/o PKC sobre este receptor, interfiriendo con el proceso de endocitosis dependiente de β -arrestina.

- En presencia de la RGS14 la desensibilización del receptor μ por morfina implica la activación de una quinasa (CaMKII) dependiente del receptor de NMDA. Esta CaMKII participa en el secuestro de la transducción del receptor opioide y conduce a la tolerancia.

- Los resultados obtenidos confirman que la estimulación del sistema opioide con morfina promueve la activación de las proteínas de la familia del Ras así como las rutas de MAPK con las que están relacionados. También se demuestra la importancia de la proteína RGS14 para el reclutamiento de las proteínas de los diferentes niveles de la cascada en la membrana celular y más concretamente en el entorno del receptor MOR lo que contribuye a la regulación del efecto que estas vías de señalización tienen sobre el sistema glutamatérgico y el tráfico de receptores AMPAR

- Este trabajo ha contribuido a describir la existencia de un módulo de señalización compuesto por HINT1/RGSZ2 y su asociación con el receptor opioide μ para modular el efecto de la morfina y prevenir la desensibilización del receptor.

- Los resultados obtenidos demuestran que en el SN, tanto el receptor CB1 como el opioide μ regulan subunidades $G_{\alpha z}$, interactúan con el módulo HINT1-RGSZ2 y comparten los efectores localizados en esta vía de señalización. El trabajo describe por vez primera la vinculación entre el receptor CB1 y la subunidad αz de las proteínas G, y la identifica como principal responsable de la persistente desensibilización del receptor CB1 en el cerebro.

Estos datos han dado lugar a diferentes publicaciones y comunicaciones en congresos nacionales e internacionales:

PUBLICACIONES

Garzón, J., Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E. and Sánchez-Blázquez, P. *Effector antagonism by RGS proteins causes desensitization of mu-opioid receptors in the CNS*. *Psychopharmacology* (2005) 180: 1-11

Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., Sánchez-Blázquez, P and Garzón, J. *Morphine induces endocytosis of neuronal mu-opioid receptor through the sustained transfer of Galpha subunits to RGS2 proteins*. *Molecular Pain* (2007) 17: 19-

Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., Gaitán G, Sánchez-Blázquez, P and Garzón, J. *RGS14 prevents morphine from internalizing mu-opioid receptors in periaqueductal gray neurons*. *Cellular Signalling* (2007) 19: 2558-2571

Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Montero C., de la Torre-Madrid, E. and Garzón, J. *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II supports morphine antinociceptive tolerance by phosphorylation of glycosylated phosducin-like protein*. *Neuropharmacology* (2008) 54(2): 319-330

Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., Sánchez-Blázquez, P., Wang, JB. and Garzón, J. *NMDAR-NOS generated zinc recruits PKCgamma to the hint-RGS17 complex bound to the c terminus of mu-opioid receptors* *Cellular Signalling* (2008) 20(10): 1855-1864

Garzón, J., de la Torre-Madrid, E., Rodríguez-Muñoz, M., Vicente-Sánchez, A. and Sánchez-Blázquez, P. *Gz mediates the long-lasting desensitization of brain CBI receptors and is essential for cross-tolerance with morphine*. *Molecular Pain* (2009) 10(5): 11-

Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., de la Torre-Madrid, E., and Garzón, J. *Brain-specific galphaz interacts with src tyrosine kinase to regulate mu-opioid receptor-NMDAR signaling pathway*. *Cellular Signalling* (2009) 21(9): 1444-1454.

CONGRESOS

- INTERNACIONALES

Galphaz subunits are essential partners for permanent association of receptor-activated galphai subunits to RGS9-2 proteins.

Cell Signalling World 2006. Luxemburgo

RGS14 prevents morphine from internalizing mu-opioid receptors in the mouse brain.

CaMKII phosphorylation of phosducin-like protein supports mu-opioid receptor desensibilization.

International narcotics research conference 2007. Berlin

- NACIONALES

Regulation of non-receptor-type tyrosine kinases of src family by mu-opioid receptor-activated gaz and gai2 subunits.

The RGS14 regulator of g-protein signalling acts as a brake for mu-opioid receptor-induced activation of ERK1/2

XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Santiago de Compostela 2006.

Mu-opioid receptors when coupled to RGS14 proteins elude internalization by morphine.
The NMDA receptor antagonist MK801 prevents downregulation of cannabinoid CBI receptors in mouse PAG neurons.

XXIX Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Alcalá de Henares 2007.

The protein kinase C interacting protein, PKCI-1, modulates cannabinoid (CBI) receptor signalling
XXX Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Bilbao. 2008

En Madrid, a 28 de Abril de 2010

Fdo. Dr. Javier Garzón Niño

Fdo. Dra. María Rodríguez Muñoz

“Y vio Dios todo lo que había hecho,
y he aquí que era bueno en gran manera”

Génesis 1: 31

"Hay dos formas de ver la vida:
una es creer que no existen milagros,
la otra es creer que todo es un milagro".

A. Einstein

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Abstract | 1 |
| Introducción | 3 |
| 1. Receptores opioides | 4 |
| 1.1. Clasificación de los receptores opioides | 4 |
| 1.2. Los receptores opioides son receptores acoplados a proteínas G | 5 |
| 1.3. Proteínas G heterotriméricas | 6 |
| 1.3.1. Ciclo de activación de las proteínas G | 8 |
| 2. Mecanismos de regulación de la señalización del receptor opioide | 10 |
| 2.1. Desensibilización del receptor opioide | 10 |
| 2.2. Regulación de señalización de proteínas G | 11 |
| 2.2.1. Proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G | 11 |
| 2.2.1.1. Subfamilia RGS-R4 | 13 |
| 2.2.1.2. Subfamilia RGS-R7 | 13 |
| 2.2.1.3. Subfamilia RGS-R12 | 14 |
| 2.2.1.4. Subfamilia RGS-RZ | 15 |
| 2.2.1.5. Subfamilias RGS-RA, RGS-RL | 16 |
| 2.2.2. Proteínas tipo fosducina (PhLP) | 16 |
| 3. Vía de señalización de las MAPK | 17 |
| 3.1. Familia de los Ras | 19 |
| 3.2. Familia de los Raf | 20 |
| 4. Receptores de glutamato | 21 |
| 4.1. Cascada del NMDA/óxido nítrico | 23 |
| 4.2. Plasticidad sináptica | 24 |
| 5. Sistema cannabinoide | 26 |
| 5.1. Receptores cannabinoides | 27 |
| 5.2. Señalización cannabinoide | 29 |
| Antecedentes y Objetivos | 31 |
| Resultados | 33 |
| 1. Estudio comparativo de analgesia y tolerancia de morfina/DAMGO | 33 |
| 1.1. Estudios funcionales | 33 |
| 1.1.1. Administración aguda de opioides: desarrollo de tolerancia aguda a una dosis icv de morfina/DAMGO en el ratón | 33 |
| 1.2. Estudios moleculares | 36 |
| 1.2.1. Desensibilización del MOR por fosforilación/internalización | 36 |
| 1.2.1.1. Efecto de una dosis única de opioides en el MOR | 37 |
| A. Fosforilación e internalización inducidas por morfina | 37 |
| B. Fosforilación e internalización inducidas por DAMGO | 39 |
| 1.2.1.2. Efecto de dosis repetidas de opioides en el MOR | 41 |
| A. Dos dosis agudas | 41 |
| B. Repetidas dosis agudas | 42 |
| B.1. Subfraccionamiento celular tras el tratamiento con DAMGO | 44 |
| C. Administración crónica | 45 |

| | |
|--|-----|
| 1.2.2. Desensibilización del MOR por transferencia de subunidades $G\alpha$ | 47 |
| 2. Estudio de los reguladores de proteínas G: RGS | 48 |
| 2.1. Proteínas de la subfamilia R12 | 48 |
| 2.2. La proteína RGS14 | 50 |
| 2.2.1. Asociación de la RGS14 con GPCRs | 52 |
| 2.2.2. Asociación de la RGS14 con MOR tras su activación por agonistas | 53 |
| 2.2.3. Reducción de la expresión de la RGS14: <i>knockdown</i> | 54 |
| 2.2.4. Influencia del <i>knockdown</i> de la RGS14 en la analgesia mediada por el MOR | 55 |
| 2.2.5. Influencia del <i>knockdown</i> de la RGS14 en el MOR durante su activación con morfina | 57 |
| 3. Implicación de la vía de las MAPK en la señalización opioide | 59 |
| 3.1. Efecto de la morfina en la traslocación de las proteínas de la cascada de las MAPK | 60 |
| 3.2. Activación de las proteínas G monoméricas promovida por morfina | 60 |
| 3.3. RGS14 como proteína <i>scaffold</i> para la cascada de las MAPK | 63 |
| 3.4. Efecto del <i>knockdown</i> de la RGS14 en la activación de las proteínas de la cascada de las MAPK promovida por morfina | 64 |
| 3.5. Tráfico de receptores NMDAR y AMPAR inducido por morfina | 68 |
| 3.6. Efecto del <i>knockdown</i> de la RGS14 en el tráfico de receptores NMDAR y AMPAR | 69 |
| 4. Señalización MOR-NMDA | 71 |
| 4.1. Papel de la CaMKII | 71 |
| 4.2. Papel de la PKC | 73 |
| 4.2.1. Dependencia de la HINT1 | 74 |
| 4.2.1.1. Efecto de la ausencia de HINT1 en la señalización del MOR | 76 |
| 4.2.1.2. Influencia del Zn^{2+} | 77 |
| 4.2.1.3. Fuente fisiológica de Zn^{2+} | 81 |
| 5. Sistema cannabinoide | 82 |
| 5.1. Analgesia y tolerancia producida por cannabinoides | 82 |
| 5.2. Detección del receptor CB1R | 85 |
| 5.3. Internalización del CB1R | 86 |
| 5.3.1. Subfraccionamiento celular tras el tratamiento con WIN55,212-2 | 87 |
| 5.4. Implicación de las subunidades $G\alpha$ en la señalización cannabinoide | 89 |
| 5.4.1. Transferencia de proteínas $G\alpha$ | 90 |
| 5.4.2. Reducción de la expresión de las subunidades $G\alpha$ | 91 |
| 5.5. Tolerancia cruzada entre CB1R y MOR | 94 |
| 5.6. CB1R y el módulo HINT1-RGSZ | 96 |
| Discusión | 99 |
| 1. Desarrollo de tolerancia: pérdida de función de los receptores opioides y cannabinoides | 99 |
| 1.1. Mecanismos de tolerancia que afectan al propio receptor: fosforilación e internalización del MOR | 100 |
| 1.2. Mecanismos de tolerancia que implican a la transducción: desacoplamiento de subunidades $G\alpha$ | 103 |
| 2. Implicación de la RGS14 en la señalización mediada por los MOR | 104 |
| 2.1. Activación de la cascada de las MAPK por morfina: papel de la RGS14 | 105 |

| | |
|---|-----|
| 3. Señalización MOR-NMDA-MAPK | 107 |
| 4. Señalización MOR-NMDAR/óxido nítrico | 110 |
| 5. Resumen del trabajo | 112 |
| Conclusiones | 115 |
| Materiales y Métodos | 117 |
| 1. Materiales | 117 |
| 1.1. Animales de experimentación | 117 |
| 1.2. Anticuerpos | 117 |
| 1.3. Drogas y fármacos | 118 |
| 2. Métodos | 118 |
| 2.1. Medida del efecto analgésico | 118 |
| 2.2. Tolerancia y dependencia | 119 |
| 2.2.1. Administración aguda en el ratón: tolerancia producida por una dosis icv en el ratón | 119 |
| 2.2.2. Administración crónica de opioides: desarrollo de tolerancia y dependencia morfínica en el ratón | 119 |
| 2.3. Diseño y síntesis de oligodeoxinucleótidos antisentido empleados en este estudio | 120 |
| 2.4. Producción de proteínas recombinantes | 121 |
| 2.4.1. Proteínas recombinantes B-Raf(RBD)-GST y RalGDS(RBD)-GST | 121 |
| 2.4.1.1. Clonaje del dominio RBD de las proteínas B-Raf y RalGDS | 121 |
| 2.4.1.2. Obtención de las proteínas recombinantes | 121 |
| 2.4.2. Proteínas recombinantes CB1R-Ct-GST y RGS14-GST | 122 |
| 2.4.2.1. Clonaje del extremo Ct del receptor CB1R | 122 |
| 2.4.2.2. Clonaje de la proteína RGS14 | 122 |
| 2.4.2.3. Obtención de las proteínas recombinantes | 123 |
| 2.4.3. Electroelución de la proteína recombinante | 123 |
| 2.5. Preparación de los componentes celulares para su análisis | 124 |
| 2.5.1. Fraccionamiento de las estructuras del SNC de ratón | 124 |
| 2.5.2. Subfraccionamiento de la fracción soluble del PAG de ratón | 124 |
| 2.5.3. Purificación de proteínas glicosiladas de SNC de ratón | 125 |
| 2.6. Ensayos de precipitación de proteína | 125 |
| 2.6.1. Inmunoprecipitación de proteínas | 125 |
| 2.6.2. Inmunoprecipitación de proteínas en condiciones desnaturalizantes | 126 |
| 2.6.3. Ensayos de <i>pull-down</i> | 127 |
| 2.7. Detección de proteínas en cerebro de ratón. Electroforesis de proteínas y transferencia a soporte sólido (<i>Western blotting</i>) | 127 |
| 2.8. Ensayos <i>in vitro</i> | 128 |
| 2.9. Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (PCRQ) | 128 |
| Bibliografía | 131 |
| ANEXO | 153 |
| - Artículos publicados) | 153 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| AC | Adenilato ciclasa |
| ACEA | Araquidonil-2-cloroetilamida |
| AMPA | Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| CaM | Calmodulina |
| CaMKII | Quinasa dependiente de calcio-calmodulina |
| CBR | Receptor cannabinoide |
| CR | Región constante |
| CRD | Dominio rico en cisteína |
| Ct | Extremo carboxilo terminal |
| DAG | Diacilglicerol |
| DAMGO | [D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly-ol ⁵]-encefalina |
| DOR | Receptor opioide delta |
| EAM | Efecto analgésico máximo |
| ERK | Quinasas reguladas por señales extracelulares |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GAP | Proteína activadora de la GTPasa |
| GDI | Inhibidor de la disociación de nucleótido de guanidina |
| GDP | Guanosina difosfato |
| GEF | Factor de intercambio de nucleótido de guanidina |
| Glu | Glutamato |
| GMPc | Guanosina monofosfato cíclico |
| GPCR | Receptor acoplado a proteínas G |
| GRK | Quinasa de GPRC |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| HINT | Proteína de unión a la tríada de histidinas |
| JNK | Quinasa del amino terminal de c-Jun |
| KOR | Receptor opioide kappa |
| LTD | Depresión a largo plazo |
| LTP | Potenciación a largo plazo |
| MAPK | Quinasa activada por mitógenos |
| MOR | Receptor opioide mu |
| NMDA | Ácido N-metil-D-aspartico |
| NO | Óxido Nítrico |
| NOS | Óxido Nítrico Sintasa |
| Nt | Extremo amino terminal |
| PAG | Sustancia gris periacueductal |
| PDZ | Acrónimo de: proteína de densidad postsináptica (PSD95), una supresora de tumores en <i>Drosophila</i> (DlgA), y la proteína zonula occludens-1 (zo-1) |
| PhLPI | Proteína tipo fosducina |
| PKA | Proteína quinasa A |
| PKB | Proteína quinasa B |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PKCI | Inhibidor de la proteína quinasa C |
| PLC | Fosfolipasa C |

| | |
|--------------------|--|
| PSD | Región densa post-sináptica |
| RBD | Dominio de unión a Ras |
| RGS | Regulador de la señalización de las proteínas G |
| RID | Dominio de interacción con Rap |
| SNC | Sistema nervioso central |
| THC | Δ^9 -tetrahidrocannabinol |
| WIN55,212-2 | (R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrol[1,2,3-de)-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetanona |



Abstract

In the nervous system, G-protein-coupled mu-opioids receptors (MORs) drive the initial steps of both positive effects of opioids, antinociception, and their addictive effects, tolerance and dependence. A single acute dose of morphine induces a strong desensitization without promoting the phosphorylation and recycling of MORs. The administration of subsequent doses or continuous administration of morphine leads to the phosphorylation and internalization of MORs. On the other hand DAMGO induces a robust internalization and recycling of MORs and a lower level of tolerance. However when these opioids are used in demanding protocols, the agonists deplete the surface MORs before the novo synthesis can replenish the system, leading inevitably to desensitization. There are different mechanisms implicated in the MOR desensitization, we studied some of them and our results could resume as follow :

- The sequestering of activated G α subunits by certain RGS proteins reduces the responses to the agonist in neurons. Morphine induces a long-term transfer of G α subunits that remains even when the drug effects have dissapeared. During the time-course of the effects of DAMGO, the G α subunits underwent a transient transfer to RGS proteins and later, the recycled MORs in the plama membrane recovered control over these G proteins and the response to DAMGO was resensitized.

- Morphine but not DAMGO provokes a sustained activation of CaMKII. Morphine triggers a NMDA/CaMKII-mediated mechanism to desensitize the MORs in the plasma membrane and receptor phosphorylation/internalization disrupts this negative feedback regulation. In morphine-activated MORs the RGS14 protein prevents GRKs from phosphorylating those residues required for β -arresting-mediated endocytosis. In RGS14 knockdown mice morphine promoted MOR internalization, low level of tolerance and failed to activate CaMKII.

- Morphine induces the MAPK activation. The RGS14 protein acts as a MAPK scaffold facilitating the formation of a Ras-Rap/Raf/ERK multiprotein complex to promote sustained ERK activation near from the MOR. This cascade is implicated in the development of opioid tolerance and synaptic plasticity.

- The morphine-activated MORs promote an increase in cytosolic free zinc. The NMDAR/nNOS cascade, activated via MORs, provide the free zinc ions required for inactive PKC γ to bind to HINT/RGSZ2 complex at the C terminus of the receptor. When the DAG generated by the action of opioid-released G $\beta\gamma$ dimmers on phospholipase β reaches adequate levels, PKC γ is activated and leaves the HINT1/RGSZ2 to phosphorylate their targets close to the MOR. This phosphorylation decreases the intensity of the signals evoked by morphine.

In the brain, cannabinoids can produce analgesic tolerance that is nos associated with the loss of surface CB1Rs or their uncoupling from regulated transduction. CB1Rs like MORS interact with the HINT1/RGSZ2 signaling module, and both receptors regulate Gz proteins. Neural specific Gz proteins are essential mediators of the analgesic effects of supraspinal CB1R agonist and morphine. These Gz proteins are also responsible for the long-term analgesic tolerance produced by single doses of these agonists, as well as for the cross-tolerance between CB1Rs and MORs.

Introducción

A lo largo de la historia se han aplicado gran número de terapias en un intento de aliviar el dolor. Las preparaciones curativas de la planta de la amapola de la que se extrae el opio han sido utilizadas hace cientos de años como analgésicos. En 1803, el farmacólogo alemán *W. Sertürner* purificó la morfina, principal alcaloide de los extractos de opio y el responsable de producir su efecto analgésico. En 1827, *E. Merck*, de Darmstadt en Alemania, inició la producción y la comercialización de la morfina. En 1925, *Gulland y Robinson* demostraron su estructura química. Desde entonces se han producido distintas sustancias químicas derivadas de la morfina. El uso de opioides para el tratamiento del dolor ha progresado en los últimos años gracias al mayor conocimiento sobre su eficacia y seguridad, a los cambios gubernamentales en las restricciones relativas a su uso y su mejor acceso a los pacientes.

Según un estudio reciente uno de cada cinco adultos en Europa sufre dolor crónico (*Breivik y col. 2006*); dos tercios sufren dolor moderado mientras que un tercio dolor severo; para el 64 % el control del dolor es inadecuado. La abundancia de métodos, tratamientos y modelos efectivos que existen debería suponer una mejora en la vida de muchas personas que sufren dolor crónico y, para muchos de ellos la clave de un tratamiento eficaz reside en el uso apropiado de opioides fuertes, con una evaluación y monitorización adecuadas.

En el uso terapéutico de los opioides la principal preocupación es controlar la aparición de tolerancia a sus efectos analgésicos y evitar que el incremento de dosis pueda acarrear efectos inespecíficos no deseables. Su administración repetida puede conducir a una pérdida gradual de su potencia que se conoce como desensibilización o tolerancia, esto implica que se han de utilizar dosis cada vez más elevadas para obtener el efecto deseado con el riesgo de que se presente depresión respiratoria, constipación intestinal, cambios de conducta e incluso dependencia física. En los últimos años se ha producido un aumento significativo en el uso de opioides tanto en las dosis como en la duración de los tratamientos, lo que ha contribuido a un mayor control del dolor y a una mejora en la calidad de vida de los pacientes, pero han aparecido nuevas toxicidades, neurotoxicidad inducida por opioides (NIO), es decir, la causada por acción directa en el sistema nervioso central. Esta toxicidad se ha relacionado con el fenómeno de tolerancia y con la acumulación de metabolitos tóxicos. La práctica clínica ha demostrado que la aparición de tolerancia a los efectos analgésicos de los opioides puede ser retrasada mediante procedimientos como la rotación de opioides y/o su asociación a fármacos no opioides.

El avance de la investigación básica en el campo de los opioides, con la identificación de poblaciones y subpoblaciones de receptores opioides, la detección de ligandos endógenos, la clonación de receptores y la demostración de su amplia distribución en el organismo, ha contribuido a la búsqueda y ha encontrado nuevas aplicaciones para los opioides en varias disciplinas médicas.

1. Receptores opioides

La idea de que en los animales superiores existen receptores a opioides deriva del descubrimiento de que la naloxona tritlada desplaza a la morfina de sus sitios de unión. Estos resultados fueron corroborados cuando se demostró la presencia de receptores opioides en el fleon de cobaya y en el conducto deferente de ratón (*Pert y Snyder, 1973; Pert y col. 1973; Kuhar y col. 1973*). Animales a los que se les aplicó morfina en la sustancia gris periacueductal (PAG) y en el tálamo desarrollaron analgesia y se vio que en estas áreas el receptor estaba enriquecido (*Jacquet y Lajtha, 1973; Pert y Yaksh, 1974*). Estudios posteriores demostraron que la estimulación del PAG producía analgesia, resultados que llevaron a pensar que existía en el cerebro una sustancia endógena similar a la morfina (*Mayer y Liebeskind, 1974*) y que el efecto de este opioide era revertido por la administración de naloxona (*Akil y col., 1976*).

1.1. Clasificación de los receptores opioides

El descubrimiento de las encefalinas (*Kosterlitz y Hughes, 1975; Hughes y col., 1975; Pasternak y col., 1976*), endorfinas (*Cox y col., 1976; Bradbury y col., 1976*) y dinorfinas (*Goldstein y col., 1979*) sentó las bases para el desarrollo de un importante campo de conocimiento del SNC que ha llevado al descubrimiento de más de cuarenta péptidos neuroactivos (*Lynch y Snyder, 1986*). Estudios farmacológicos concluyeron que existen diversos tipos de receptores opioides (*Pert y Snyder, 1973, 1975; Simon, 1973; Terenius, 1973; Kosterlitz y Hughes, 1975*). Inicialmente, se propusieron tres tipos de receptores: μ (mu), para aquellos a los que se une la morfina y compuestos similares; κ (kappa), que median los efectos de compuestos como la ketaciclazocina; y σ (sigma), para los que se unen drogas como la n'alilmetazocina. Poco después se identificó el receptor δ (delta) al que se unen las encefalinas (*Hughes y col., 1975; Lord y col., 1977*). Estudios posteriores confirmaron que los receptores μ , κ y δ (MOR, KOR y DOR) eran sitios de unión específicos y que se encontraban ampliamente distribuidos en el SNC de diferentes especies animales. En la actualidad se ha excluido al receptor σ de la familia de receptores opioides (*Snyder y Pasternak, 2003*). La clonación del receptor δ (*Evans y col., 1992; Kieffer y col., 1992*) dio como resultado la identificación de las subfamilias de genes de los diferentes receptores (Tabla 1). Se han publicado una serie de estudios en los que se abordan el análisis de la organización de estos genes, la estructura de las regiones promotoras y su regulación, así como la determinación de los correspondientes exones e intrones. La amplia farmacología de los opioides dio lugar a la búsqueda de lecturas alternativas de los genes que pudieran originar diferentes ARN mensajeros (ARNm) y, por tanto, subtipos de un determinado receptor (*Rossi y col., 1995; Mayer y col., 1996; Pan y col., 1999, 2001, 2003; Pasternak y col., 2004*). Para el gen del receptor μ se han identificado 15 variantes en ratón (*Paternak, 2005*), 6 para el κ (*Hu y col., 2002*) y una única forma de mensajero para el δ , aunque aún no se han correlacionado las variantes individuales con funciones específicas.

Tabla 1. Características de los receptores opioides

| | <u>μ-OR/MOR</u> | <u>δ-OR/DOR</u> | <u>κ-OR/KOR</u> |
|-----------------------------|--|--|--|
| Gen (humano) | 6q24-25 | 1p34.3-36.1 | 8q11-12 |
| Proteína | 398 aa | 372 aa | 380 aa |
| Péptidos opioides endógenos | β -Endorfina Endo morfina 1-2 [Met ⁵]-Encefalina | β -Endorfina [Leu ⁵]-Encefalina [Met ⁵]-Encefalina | Dinorfina A |
| Agonistas selectivos | DAMGO Fentanilo Heroína Morfina | DPDPE [D-Ala ² ,Glu ⁴]Deltorfina DSLET BW373U86 SNC80 | U-69593 Enadolina U-50488 Bremazocina EKC |
| Antagonistas selectivos | β -FNA M-CAM CTAP CTOP Cyprodime | BNTX DALCE Naltriben 5'-NTII TIPP (ψ) Naltrindol ICI-174,864 | Nor-BNI GNTI |
| Agonistas no selectivos | β -CNA Naloxona Naltrexona Diprenorfina | β -CNA Naloxona Naltrexona Diprenorfina | β -CNA Naloxona Naltrexona Diprenorfina |

Abreviaturas: DAMGO: [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol⁵]-Encefalina. DPDPE: [D-Pen^{2,5}]-Encefalina. U-69593: (+)-(5 α ,7 α ,8 β)-N-Metil-N-[7-(1-pirrolidinil)-1-oxaspiro[4.5]dec-8-il]bencenacetamida. PL 017: Tyr-Pro-MePhe-D-Pro. DSLET: [D-Ser²,Leu⁵,Thr⁶]-Encefalina. U-50488: 3,4-Dicloro-N-Metil-N-[2-(1-pirrolidinil)ciclohexil]bencenacetamida. BW373U86: (\pm)-(1[S*]2 α ,5 β)-4-[(2,5-Dimetil-4-(2-propenil)-1-piperazinil][3-hidroxifenil]metil)-N,N-dietilbenzamida. SNC80: (+)-4-[(α R)- α -((2S,5R)-4-alil-2,5-dimetil-1-piperacil)-3-metoxi-bencil]-N,N-dietilbenzamida. EKC: Etiketociclazocina. β -FNA: β -Funaltrexamina. BNTX: (E)-7-Benzilidenonaltrexona. nor-BNI: nor-Binaltorfimina. M-CAM: Metocinamox. DALCE: [D-Ala², Leu³, Cys⁶]-Encefalina. GNTI: 5'-Guanidilaltrindol. J-113397: 1-[(3R,4R)-1-cicloocilometil-3-hidroximetil-4-piperidinil]-3-etil-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-ona. CTAP: D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-PheThr-NH₂. CTOP: D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-PheThr-NH₂. 5'-NTII: Naltrindol 5'-isotiocianato. TIPP(ψ): H-Tyr-Tic ψ -[CH₂NH]Phe-Phe-OH. ICI 174,864: N,N-Dialil-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu. β -CNA: β -Clornaltrexamina.

1.2. Los receptores opioides son receptores acoplados a proteínas G

Los receptores opioides pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Estos receptores están formados por una única cadena aminoacídica que pasa siete veces a través de la bicapa lipídica, el extremo amino terminal se orienta hacia el espacio extracelular y el carboxilo terminal hacia el citosol. Los dominios transmembranales (TM I-VII), donde abundan los aminoácidos de carácter hidrofóbico, se unen por tres bucles extracelulares (E1, E2, E3) y tres intracelulares (I1, I2, I3) que son ricos en aminoácidos que les confieren propiedades hidrofílicas.

El conjunto se organiza con los dominios transmembranales alrededor de un receptáculo central en el que se encuentran los principales determinantes de su selectividad por las señales extracelulares que ha de discriminar. El dominio constituido por el carboxilo terminal, el tercer y probablemente el segundo bucle intracelular, es el que se relaciona con la subunidad α de las proteínas transductoras G

(Figura 1). Las secuencias aminoacídicas de estos receptores comparten un 60 % de identidad siendo las regiones transmembranales las zonas más conservadas (73-76 % de homología). Las regiones extracelulares son considerablemente divergentes (34-40 % de identidad).

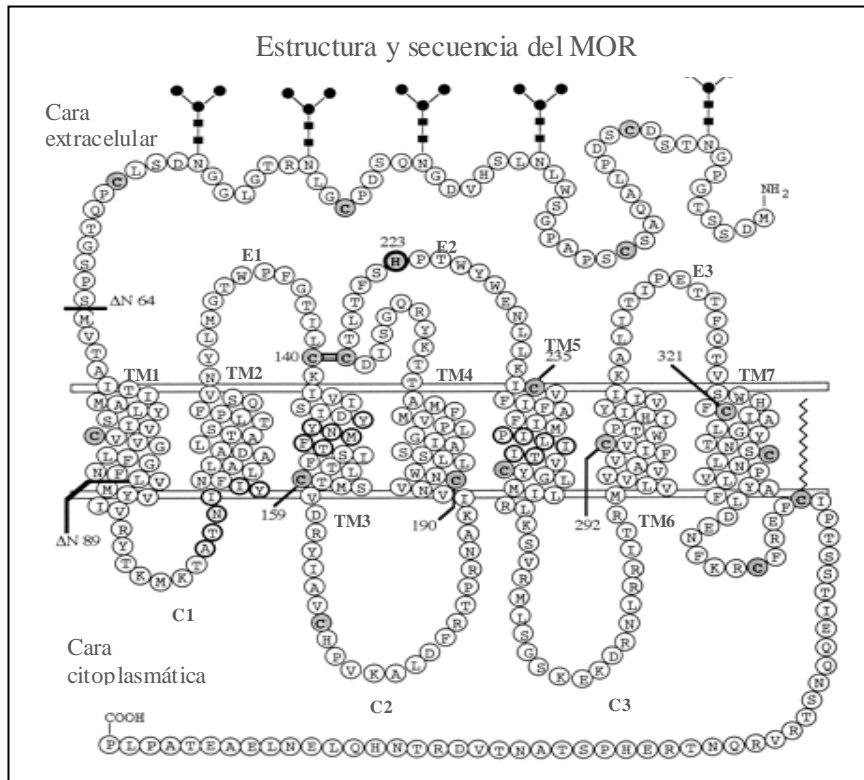


Figura 1. Secuencia aminoacídica y estructura propuesta para el receptor opioide μ (MOR). Se indican el extremo amino terminal, las regiones transmembrana TM1-TM7, los bucles extracelulares E1-E3, los bucles citosólicos C1-C3 y el extremo carboxilo terminal. Se muestran los posibles lugares de glicosilación (residuos ramificados) y un residuo palmitoilado en el extremo carboxilo terminal, cuyo grupo se inserta en la bicapa lipídica. *Adaptado de Shahrestanifar y col., 1996.*

Los receptores opioides son proteínas altamente *N*-glicosiladas (*Liu-Chen y col., 1993; Garzón y col., 1995*) y regulan a las proteínas Gi/o/z/q/11 (*Sánchez-Blázquez y col., 1993; Garzón y col., 1994, 1997; Standifer y col., 1996*) por interacción directa (*Georgoussi y col., 1995; Chalecka-Franaszek y col., 2000*).

1.3. Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas están formadas por tres subunidades diferentes $\text{G}\alpha\beta\gamma$ (Figura 1). Se han identificado 21 subunidades α diferentes, 5 subunidades β y 12 subunidades γ (*Gierschik y col., 1986; Hamm y Gilchrist, 1996; Schwindinger y Robishaw, 2001*); aunque no se dan todas las posibles combinaciones entre ellas parecen existir una serie de formaciones preferidas (*Kleuss y col.,*

1992, 1993; Ho y col., 1999; Robillard y col., 2000).

Las subunidades $G\alpha$ son proteínas de 39-52 kDa formadas por dos dominios: un dominio Ras o dominio GTPasa, común a todas las proteínas de la familia de las GTPasas para llevar a cabo la hidrólisis de nucleótidos de guanina; y un dominio helicoidal donde residen las mayores divergencias entre ellas (Figura 2.A). Se agrupan en cuatro grupos según la identidad de las secuencias aminoacídicas y sus diferencias funcionales: *Gas*, *Gai*, *Gaq*, *Ga12* (Casey y col., 1990; Neer, 1995; Sprang, 1997).

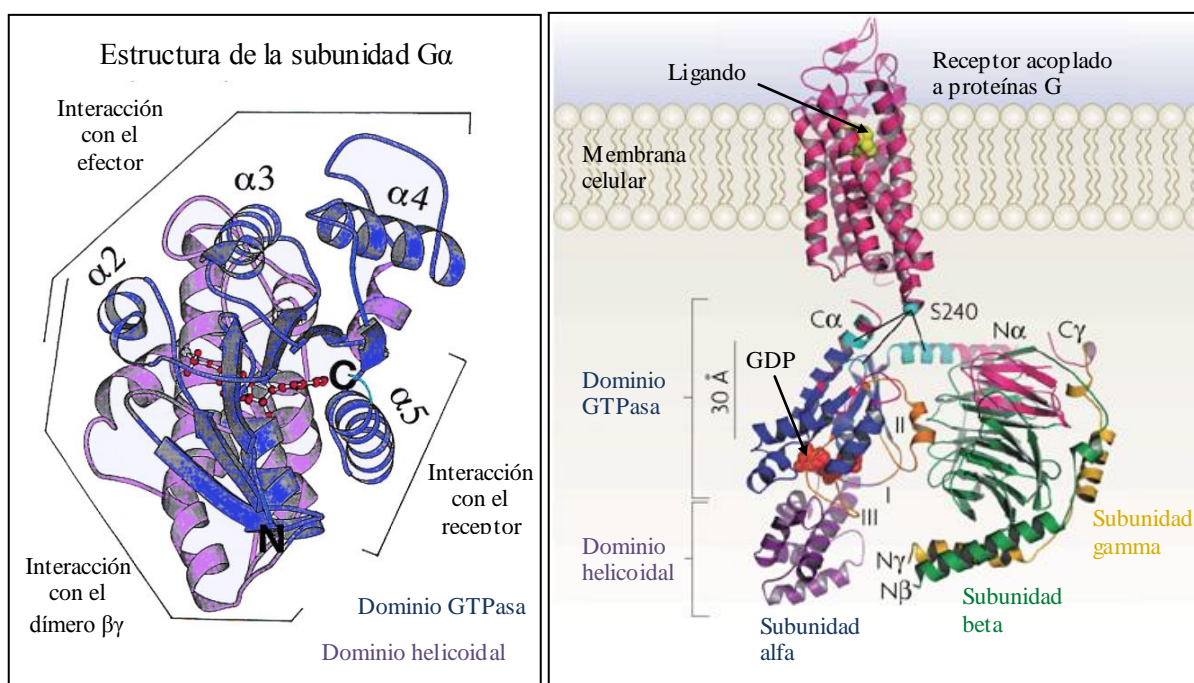


Figura 2. Receptor acoplado a proteína G. A. Estructura de la subunidad alfa (azul el dominio GTPasa, morado el dominio helicoidal) con las regiones de interacción con el receptor, el dímero beta-gamma y el efector. B. Estructura tridimensional del complejo formado por un receptor con sus siete dominios transmembrana (fucsia), acoplado a una proteína G heterotrimérica, formada por la subunidad alfa, la subunidad beta (verde) y la subunidad gamma (amarillo). Estudios bioquímicos han identificado sitios de contacto entre el receptor y la proteína G (cian). Un punto de interacción sería la Ser240 del tercer bucle intracelular del receptor (esfera cian) con regiones específicas del extremo amino terminal ($N\alpha$) y carboxilo terminal ($C\alpha$) de la subunidad $G\alpha$ y el bucle $\alpha 4$ - $\beta 6$ (cian). Estas regiones de contacto junto con las modificaciones por ácidos grasos del $N\alpha$ y del $C\gamma$ orientan al trímero respecto a la membrana, situando el GDP (esferas rojas) en el sitio de unión a nucleótido de la $G\alpha$ (azul) a aproximadamente 30 Å del sitio de contacto con el receptor. Adaptado de Oldham y Hamm, 2008.

La subunidad $G\beta$ tiene un peso molecular de 36 kDa y adopta una forma cilíndrica de hélice β integrada por siete bloques, que dejan en el centro de la hélice un poro. Las subunidades $G\gamma$ presentan un peso molecular de 6-9 kDa y su estructura es casi lineal, a excepción de su extremo amino-terminal helicoidal. Las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ permanecen unidas actuando como dímero. La activación del

receptor expone el sitio de unión a las proteínas G que está formado por los bucles intracelulares del receptor (Figura 2.B).

1.3.1. Ciclo de activación de las proteínas G

En reposo la subunidad $G\alpha$ porta una molécula de GDP y se encuentra asociada al dímero $G\beta\gamma$ formando un heterotrímero inactivo capaz de acoplarse a los receptores. Tras la unión del agonista, el receptor activado actúa como catalizador del intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) en las proteínas G, la subunidad α intercambia su GDP por GTP y modifica su estructura tridimensional de forma que se disocia del dímero $G\beta\gamma$ y del receptor. Las subunidades disociadas pueden regular la actividad de diversos efectores. La hidrólisis del GTP determina la vida media de la señalización. El dímero $G\beta\gamma$ se reasocia rápidamente con la $G\alpha$ en GDP, quedando de nuevo disponible el trímero para interactuar con el receptor. La subunidad $G\alpha$ posee actividad GTPasa intrínseca, aunque existen proteínas para ellas que aceleran este proceso (GAP) (Figura 3).

Entre los posibles efectores de las proteínas G heterotriméricas se encuentran: adenilato ciclasas (AC), guanilato ciclasas, fosfodiesterasas, canales de K^+ , fosfolipasa A2, fosfolipasa C y fosfoinosítido 3-quinasa; provocando la activación o inhibición de gran variedad de segundos mensajeros como el AMPcíclico, GMPcíclico, diacilglicerol (DAG), inositol (3, 4, 5)-trifosfato, ácido araquidónico y ácido fosfatídico además de provocar incrementos en la concentración intracelular de Ca^{2+} y la apertura o cierre de gran variedad de canales iónicos.

El perfil de acoplamiento de los receptores opioides a las proteínas G es similar. En general, la activación de los receptores opioides conduce a la inhibición de la AC, estimulación de los canales de K^+ y modulación de los canales de Ca^{2+} . Los agonistas opioides muestran diferente afinidad por el MOR dependiendo si está acoplado a una G_i , G_o o G_z (Garzón y col., 1998; Stanasila y col., 2000; Massotte y col., 2002) y este acoplamiento va a determinar el patrón de activación de las proteínas G (Sánchez-Blázquez y col., 2001). La señalización del receptor MOR está estrechamente ligada a la $G_{\alpha z}$.

Recientes observaciones han incluido en las acciones de los opioides la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Williams y col., 2001), la activación de la cascada de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Yoburn y col., 2003), el control de la proteína quinasa B (PKB/AKT) (New y col., 2007), la regulación de la actividad de activadores específicos de la actividad GTPasa de los Rap1 (RapGAP) (Meng y col., 1999, Mochizuki y col., 1999; Jordan y col., 1999) y la modulación de la actividad de la tirosina quinasa Src (Ma y col., 2000).

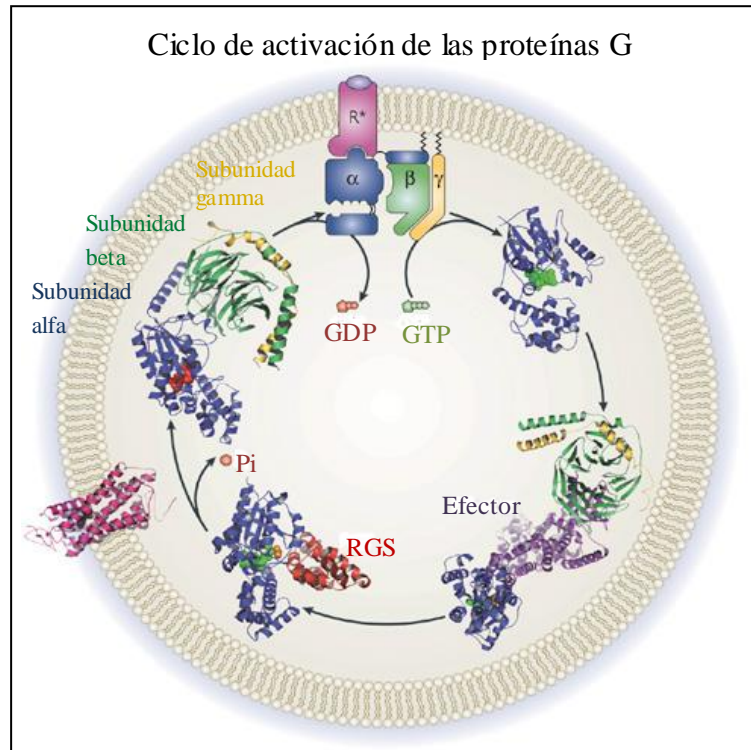


Figura 3. Ciclo de activación de las proteínas G. En reposo, las proteínas G son heterotrímeros constituidos por la subunidad G alfa (α , azul) unida a GDP, la subunidad beta (β , verde) y la subunidad gamma (γ , amarillo). La unión de un estímulo extracelular (morado) al receptor (rosa) hace que éste se active (R^*) promoviendo un cambio conformacional que permite la liberación del nucleótido GDP de la $G\alpha$. La unión de GTP (verde) a $G\alpha$ desestabiliza el complejo permitiendo que la subunidad $G\alpha$ -GTP por un lado y el dímero $G\beta\gamma$ por otro puedan unirse a sus efectores (violeta). La señalización termina con la hidrólisis del GTP a GDP por la $G\alpha$, que puede ser catalizado por un regulador de la señalización de las proteínas G (RGS, rojo). GEF: *guanine nucleotide exchange factor*; GDI, *guanine nucleotide dissociation inhibitor*; GAP, *GTPase activating protein*. Adaptado de Oldham y Hamm, 2008.

2. Mecanismos de regulación de la señalización del receptor opioide

2.1. Desensibilización del receptor opioide

La fosforilación de residuos intracelulares del receptor, seguida de la internalización, es el mecanismo de desensibilización de receptores GPCR más común. La activación de GPCR por agonistas produce la separación del trímero $G\alpha\beta\gamma$. El aumento de los dímeros $G\beta\gamma$ libres facilita su unión a las quinasas de receptores G (GRK) llevándolas al entorno del receptor. Las GRK reconocen como sustrato al receptor cuando está presente el agonista y lo fosforilan en residuos de serina o treonina de la parte citosólica. Estas modificaciones permiten a las β -arrestinas unirse a los residuos fosforilados iniciándose así el proceso de endocitosis (*Lefkowitz, 1998; Pitcher y col., 1998; Lefkowitz y Shenoy, 2005*). En el interior celular el receptor puede volver de nuevo a la superficie de la membrana celular o seguir una vía de proteólisis. La vuelta del receptor endocitado a la membrana facilita que se recupere la respuesta a agonista (*Ferguson y col., 1998*). La degradación proteolítica del receptor en los lisosomas reduce el número de receptores en superficie, disminuyendo su respuesta (*Trejo y col., 1998*).

Este proceso ha sido bien documentado para los receptores opioides mu, delta y kappa en cultivos celulares (*Chavkin y col., 2001*). En este sistema, se ha demostrado que la desensibilización e internalización de receptores mu es dependiente de agonista. Aunque los mecanismos esenciales de regulación del MOR establecidos en cultivos celulares se pueden aplicar a las neuronas, estas células altamente especializadas pueden tener sus propias vías de control de la función de los GPCR. En este sentido la expresión de ciertas RGS o de las subunidades $G\alpha\zeta$ están restringidas al sistema nervioso (*Pineyro y Archer-Lahlou, 2007*).

La fosforilación de la serina 375 en el extremo carboxilo del MOR está asociada a la internalización del receptor inducida por agonista (*El Kouhen y col., 2001; Schulz y col., 2004*). Aunque el MOR internalizado puede seguir la vía de degradación proteolítica, la mayor parte se recicla rápidamente a la membrana (*Tanowitz y von Zastrow, 2003*). La eficiencia de los agonistas opioides para estimular la endocitosis del MOR varía y está relacionada con su capacidad de promover la fosforilación e internalización del receptor dependiente de GRK (*Koch y col., 2001; Zhang y col., 1998*).

En el SNC, agonistas como el DAMGO y la etorfina son capaces de producir internalización del receptor (*Keith y col., 1998; Trafton y col., 2000; Walwyn y col., 2004*), no así la morfina que, aunque produce una marcada desensibilización del MOR, no llega a provocar su retirada de la membrana (*Arden y col., 1995; Keith y col., 1996, 1998; Finn y Whistler, 2001*). Agonistas opioides que promueven una eficiente internalización del MOR no tienen por qué tener asociado el desarrollo de

una elevada tolerancia (*Koch y col., 2005*). Estudios de *binding* muestran que la fuerte tolerancia a morfina y opioides relacionados como la heroína se debe a una pérdida de la afinidad de los agonistas mu por sus receptores (*Werling y col., 1989; Buzas y col., 1996; Keith y col., 1996; Sternini y col., 1996; Bohn y col., 2000; Finn y Whistler 2001; Garzón y col., 2005*).

2.2. Regulación de señalización de proteínas G

La regulación de las subunidades $G\alpha$ GTP y de los dímeros $G\beta\gamma$ va a determinar la potencia y la duración de los efectos de los agonistas. En los últimos años, se han estudiado elementos de la transducción que están implicados en la desensibilización del receptor como las proteínas RGS que actúan directamente sobre las subunidades $G\alpha$ activadas (*Garzón y col., 2001, 2003, 2004; Sánchez-Blázquez y col., 2003*) o las proteínas tipo fosducina (PhLP) que regulan los dímeros $G\beta\gamma$ (*Garzón y col., 2002*).

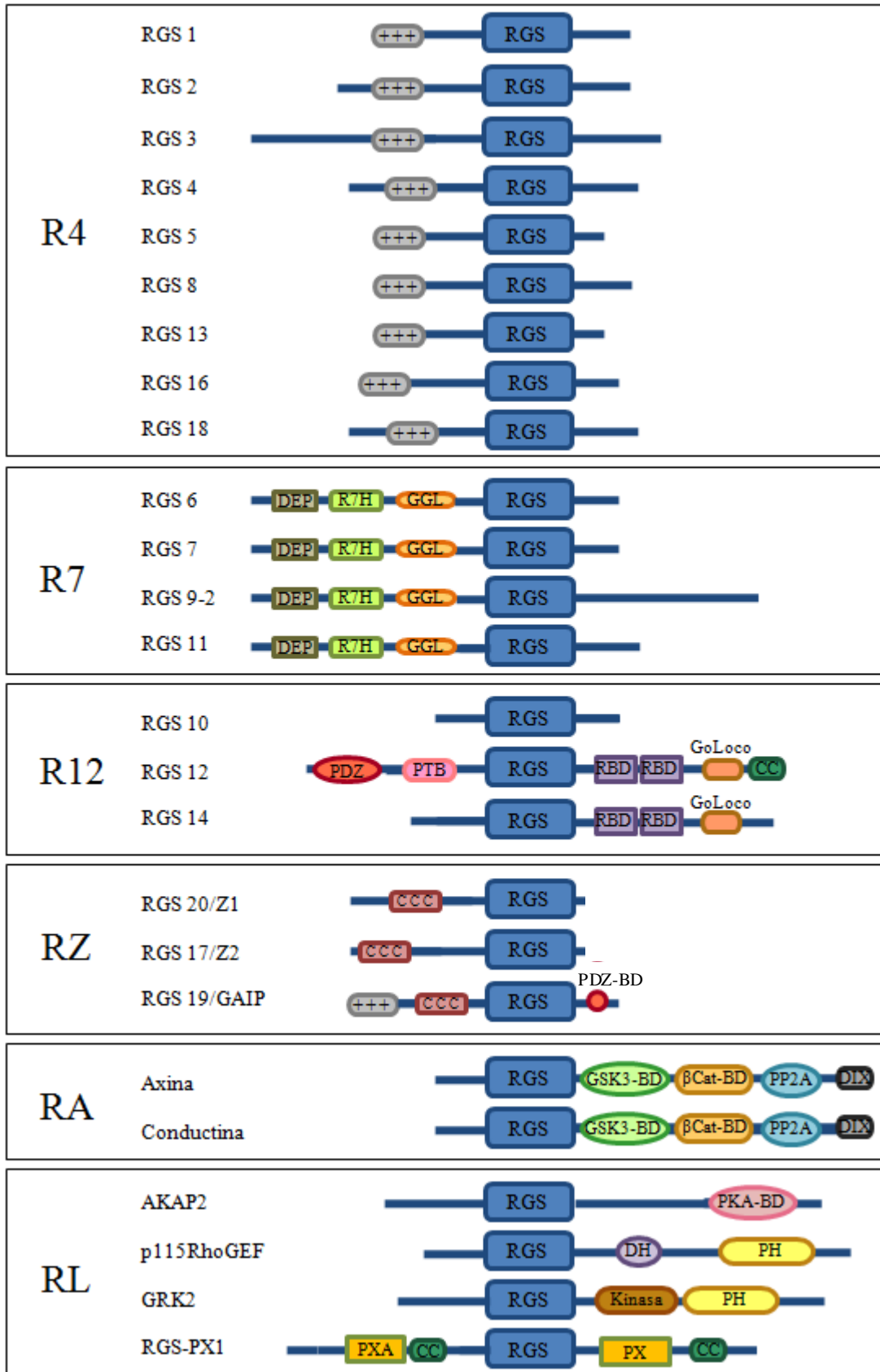
2.2.1. Proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G: RGS

Se han descrito más de 30 proteínas que contienen el dominio RGS o *RGS-like*. Las proteínas RGS son GAP para las subunidades α de las proteínas G heterotriméricas $G_i/o/z/t/q$. Su capacidad GAP está mediada por el dominio RGS, una región conservada evolutivamente de 130 aminoácidos. Estas proteínas difieren en su tamaño, su secuencia aminoacídica y su distribución en el organismo.

Este dominio RGS se organiza en nueve α -hélices que conforman dos subdominios globulares (*Tesmer y col., 1997; Carman y col., 1999; Longenecker y col., 2001; Zheng y col., 2001*). Según su secuencia de aminoácidos de la región RGS, estas proteínas han sido clasificadas en subfamilias: R4, R7, R12, RZ, RA y RL (*Zheng y col., 1999; Ross y Wilkie, 2000*) (Figura 4). Muchas RGS además contienen dominios adicionales que sirven de enlace entre diferentes moléculas reguladoras y así son capaces de integrar vías de señalización o movilizarse a diferentes entornos celulares.

■ **Figura 4.** Estructura y clasificación de las proteínas RGS y tipo-RGS de mamíferos. Las proteínas están orientadas con su extremo N-terminal a la izquierda y el C-terminal a la derecha y se clasifican basándose en el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio RGS. Dominios: +++, hélice anfipática; RGS, *Regulator of G protein Signalling*; DEP, *Dishevelled, EGL-10, pleckstrin*; R7H, *R7 homology domain*; GGL, *G protein gamma-like domain*; PDZ, *PSD-95, Dgl, ZO-1*; PTB, *phospho-tyr binding*; RBD, *ras binding domain*; CC, *coiled coil*; CCC, *cystein rich domain*; PDZ-BD, *PDZ binding domain*; GSK3-BD, *GSK3 binding domain*; β Cat-BD, *β -Catenin binding domain*; PP2A, *Protein Phosphatase 2A homology*; DIX, *dimerization domain*; PKA-BD, *Protein Kinase A binding domain*; DH, *Dbl homology domain*; PH, *Pleckstrin homology domain*; PXA, *Phox associated domain*; PX, *Phox homology domain*. Reproducido de *Hollinger y Hepler, 2002*.

Estructura y clasificación de las proteínas RGS y tipo-RGS de mamíferos



2.2.1.1. Subfamilia RGS-R4

Los miembros de la subfamilia RGS-R4 están cada uno codificado por un gen y son proteínas de 20-24 kDa, excepto la RGS3 que tiene 61 kDa (*Sierra y col., 2002*). Poseen una hélice anfipática en el amino-terminal (RGS1, RGS2, RGS4, RGS5, RGS8, RGS13, RGS16 y RGS18) que les permite anclarse en la membrana. Después está el dominio RGS y un pequeño extremo carboxilo-terminal. La RGS3 tiene un dominio Nt de 300 aminoácidos que la distingue de los otros miembros.

La expresión de los miembros de esta subfamilia en el ratón se corresponde con su distribución en el cerebro de rata (*Shuey y col., 1998; Saitoh y col., 1999; Doupnik y col., 2004*). La mayoría de las proteínas RGS-R4 son GAP para Gai/o/q/11 en GTP, pero no actúan sobre GasGTP y muy débilmente sobre GazGTP (*Hepler y col., 1997*). Relativo al sistema opioide, la RGS4 interacciona directamente con el extremo carboxilo del MOR (*Georgoussi y col., 2006*).

2.2.1.2. Subfamilia RGS-R7

En mamíferos, la subfamilia RGS-R7 está codificada por cuatro genes *Rgs6*, *Rgs7*, *Rgs9* y *Rgs11*. Estos genes se transcriben en diferentes ARN mensajeros generando distintas isoformas (*Rahman y col., 1999; Doupnik y col., 2001; Giudice y col., 2001*). Las proteínas RGS6, RGS7, RGS9-1 retinal y RGS11 tienen aproximadamente 50 kDa mientras que la isoforma RGS9-2 se encuentra en el SNC es de 77 kDa. Todas ellas poseen una organización similar: contienen un dominio DEP (*Dishevelled, EGL-10, pleckstrin*) y el dominio de homología de R7 (R7H), y ambos estarían implicados en el anclaje de estas proteínas a la membrana (*AxelRod y col., 1998*); un dominio similar a la subunidad $\gamma 2$ de las proteínas G (GGL) que se une específicamente a la proteína G $\beta 5$ (*Snow y col., 1998; Hepler 1999; Zhang y Simonds, 2000; Sondek y Siderovski, 2001*). El dominio DEP también parece ser el responsable de la unión de la proteína al MOR (*Ballon y col., 2006; Chen y Hamm, 2006*).

Esta familia está ampliamente expresada en el sistema nervioso, aunque cada miembro lo hace de manera preferencial en ciertas regiones. La distribución del ARN mensajero en el ratón (*Garzón y col., 2001; Zachariou y col., 2003; López-Fando y col., 2005*) es similar a la encontrada para el cerebro de rata (*Gold y col., 1997; Shuey y col., 1998; Snow y col., 1998; Rahman y col., 1999; Saitoh y col., 1999*). La G $\beta 5$ también se detecta en el SNC de ratón localizada en la membrana (*Watson y col., 1996; Sánchez-Blázquez y col., 2003*).

En el SNC, las proteínas RGS-R7 se encuentran principalmente en la membrana celular aunque también se las puede detectar en el núcleo (*Gold y col., 1997; Thomas y col., 1998; Rose y col., 2000; Zhang y Simonds, 2000, Zhang y col., 2001; Burchett, 2003*). Las proteínas RGS-R7 y las G $\beta 5$ se

encuentran siempre como heterodímeros en este tejido (*Snow y col., 1998; Zhang y Simonds, 2000*), indicando que esta asociación es necesaria para realizar su función. La localización en la membrana de las RGS-R7/G β 5 es un proceso complejo que requiere la interacción del dominio RGS con las subunidades G α o y la palmitoilación de la RGS (*Takida y col., 2005*). Asociadas a estos dímeros se han descrito las proteínas R9AP con RGS9-1/G β 5 en la retina y R7BP con las otras RGS-R7/G β 5 en el resto del SNC (*Hu y Wensel, 2002; Martemyanov y col., 2005; Drenan y col., 2005; Grabowska y col., 2008*). La R9AP y la R7BP localizan a los dímeros en la membrana a través de un dominio transmembrana y por palmitoilación respectivamente. R9BP es esencial para la regulación de la fototransducción y la percepción visual (*Nishiguchi y col., 2004; Keresztes y col., 2004; Krispel y col., 2006*). La reversión de la palmitoilación de la R7BP permite al complejo R7BP/RGS-R7/G β 5 trasladarse de la membrana al núcleo (*Drenan y col., 2005; Song y col., 2006*).

Cuando las RGS6 y RGS7 están acopladas a las G β 5 ejercen una actividad GAP moderada sobre las G α oGTP y muy débil o indetectable sobre otro tipo de G α GTP (*Posner y col., 1999*). Los complejos RGS11-G β 5 son aproximadamente doce veces más eficientes incrementando la actividad GAP sobre G α o que en las G α i1-3. No se ha detectado esta actividad en G α q/z/12/13 o G α s (*Snow y col., 1998*). Aunque los cuatro dímeros RGS-R7/G β 5 muestran una actividad similar sobre G α oGTP, su actividad GAP sobre las G α i1-2 activadas es generalmente débil (*Hooks y col., 2003*).

2.2.1.3. Subfamilia RGS-R12

Esta subfamilia está constituida por tres miembros *Rgs 10, Rgs 12 y Rgs 14* (*Sierra y col., 2002*). El producto de estos genes da lugar a proteínas que varían significativamente en tamaño y funciones. RGS10 es una pequeña proteína de 173 aminoácidos que funcionalmente es similar a los miembros de la subfamilia RGS-R4. RGS12 es una proteína de 1447 aminoácidos y que posee en su Nt un dominio PTB de unión a tirosinas fosforiladas y un dominio PDZ (PSD-95, *postsynaptic density protein; Dgl, Drosophila disc-large protein; ZO-1, a mammalian tight junction protein*) (*Snow y col., 1998*). En su extremo carboxilo posee dos dominios de unión a Ras, RBD (*Ras binding domain*), que entre ellos conforman un RID (*Rap interaction domain*), es decir, un dominio de interacción con Rap y un dominio GoLoco, que le confiere actividad GDI (*Guanine nucleotide dissociation inhibitor*) sobre subunidades G α i/o en GDP, evitando la liberación del nucleótido y con ello la unión al dímero G β γ . La RGS14 tiene 547 aminoácidos, en el Ct también presenta los dominios RBD/RDI y el GoLoco, y un corto Nt.

La traslocación de la RGS14 fuera del núcleo depende del dominio GoLoco. La interacción del GoLoco con las subunidades G α i1/3 en GDP, pero no G α i2/o/z/q/12/13, facilita su localización en la membrana plasmática (*Kimple y col., 2001, 2002; Shu y col., 2007*). Tanto la RGS12 como la RGS14 regulan la actividad de las proteínas G de dos maneras: por un lado su actividad GAP puede acelerar la

GTPasa asociada a *Gai/o* mientras que su actividad GDI puede inhibir la disociación del nucleótido en estas subunidades (*Kimple y col., 2001*), lo que influiría negativamente en la actividad Gi.

2.2.1.4. Subfamilia RGS-RZ

Los miembros de esta subfamilia están codificados por tres genes diferentes *Rgs17*, *Rgs19* y *Rgs20* de los que se generan varias isoformas por lectura alternativa (*Barker y col., 2001*, *Douppnik y col., 2001*). Los genes *Rgs17* y *Rgs20* están localizados en el genoma muy próximos a los genes de los receptores MOR y KOR respectivamente (*Sierra y col., 2002*). Las proteínas RGS-RZ, RGSZ1 (RGS20), RGSZ2 (RGS17) y GAIP (proteína de interacción con la subunidad $G\alpha$, RGS19), poseen 210-239 aminoácidos y se pueden encontrar en el SNC. Tienen un corto carboxilo terminal de 11 o 12 residuos, en el extremo amino presentan un motivo rico en cisteínas (CRD), que se puede palmitoilar ayudando a su localización en la membrana (*De Vries y col., 1996*). La proteína GAIP además presenta una hélice anfipática en el Nt y un motivo de unión a PDZ en el Ct (*De Vries y col., 1998a*; *Ross y Wilkie, 2000*). La proteína de interacción con GAIP (GIPC) está presente en cerebro, contiene un dominio PDZ, y forma complejos con GAIP y TrkA, estableciendo un posible vínculo entre las proteínas G y las vías de señalización de los receptores tirosina-quinasa (*De Vries y col., 1998b*; *Lou y col., 2001*). Los miembros de esta familia también se unen a GIPN (proteína de interacción con GAIP por el amino terminal) una ligasa-ubiquitina que une la ruta mediada por estas proteínas con la vía de degradación de $G\alpha$ (*Fisher y col., 2003*). Los ARN mensajeros de las RGS-RZ se han detectado en el SNC, las proteínas se expresan en regiones específicas (*Garzón y col., 2004*).

Las RGS-RZ pueden unirse a subunidades $G\alpha i/o/z$ activadas y tienen actividad GAP sobre todas excepto las $G\alpha q$. Aunque son más eficientes desactivando a $G\alpha zGTP$ que $G\alpha i/oGTP$, esto es especialmente evidente para las RGSZ2 (*Mao y col., 2004*). La $G\alpha z$ es una proteína restringida al sistema nervioso, con una actividad GTPásica ineficiente (*Casey y col., 1990*; *Hendry y col., 2000*). En este sistema el MOR está asociado a un módulo de señalización para controlar la actividad de las $G\alpha zGTP$. La proteína de interacción con PKC (PKCI) se asocia con el Ct del MOR y las RGSZ1 y RGSZ2 se acoplan al MOR a través de sus CRD que se unen de forma dependiente de Zn^{2+} a la tríada de histidinas del extremo carboxilo de la PKCI (*Guang y col., 2004*; *Ajit y col., 2007*). La PKCI es una proteína de 126 aminoácidos que une zinc y que puede actuar como nucleotidil-transferasa o fosfotransferasa (*Lima y col., 1997*). También se la conoce como HINT1, proteína de unión a nucleótidos, miembro de la familia de proteínas con tríada de histidinas (HIT), caracterizada por la secuencia HisXHisXHis (donde X es un aminoácido hidrofóbico). PKCI/HINT1 existe como homodímero y no requiere zinc para asociarse (*Lima y col., 1996*).

2.2.1.5. Subfamilias RGS-RA, RGS-RL

Se han descrito otras proteínas que contienen un dominio similar a RGS, se agrupan en RGS-RA y RGS-RL (*Zheng y col., 1999; Ross y Wilkie, 2000*). El dominio RGS de la subfamilia RGS-RA, axina y conductina, posee bastante homología con el resto de proteínas RGS ya descritas (*Sierra y col., 2002*), aunque no parecen actuar como GAP para *Gα* activadas. La subfamilia RGS-RL incluye varias proteínas variadas que contienen un dominio *RGS-like* como por ejemplo factores de intercambio de nucleótidos de guanidina RhoGEF, GRK, D-AKAP2 y PX1.

Las GRKs median el sistema mejor caracterizado de desensibilización de GPCRs (*Krupnick y Benovic, 1998; Pitcher y col., 1998*). Están formadas por un dominio homólogo al RGS (RH) en el amino terminal, en la parte central posee el dominio catalítico y en el extremo carboxilo terminal la GRK2 y la GRK3 presentan un dominio homólogo a la plecstrina (PH). La actividad catalítica de estas quinasas está regulada por la unión de ligandos y sustratos, no por la fosforilación de su dominio quinasa. Tanto en el extremo amino como en el carboxilo, la GRK2 presenta sitios de interacción con el receptor y de unión a caveolina o calmodulina, estos últimos regulados por fosforilación mediada por PKC (*Levey y col., 1998; Krasel y col., 2001; Eichmann y col., 2003; Ribas y col., 2007*).

El dominio RH de la GRK2 y GRK3 une subunidades *Gαq* activadas y se ha visto que la GRK2 tiene actividad sobre *Gαq* (*Carman y col., 1999; Sallese y col., 2000; Usui y col., 2000*). La fosforilación en tirosinas del RH por la Src modula la actividad sobre las *Gαq* (*Sarnago y col., 1999; Mariggio y col., 2006*). Las *Gβγ* se unen al dominio PH de la GRK2 induciendo un aumento de la fosforilación de los GPCR activados (*Eichmann y col., 2003*). La GRK2 podría unir simultáneamente el GPCR, la subunidad *Gαq* y el dímero *Gβγ* (*Lodowski y col., 2003*), una eficiente manera de atenuar la señalización mediada por estas proteínas. Las GRKs y las arrestinas son también capaces de participar en otra forma de señalización actuando como *scaffolds* multiproteicos que llevarían por ejemplo a la activación dependiente de arrestina de la cascada de las MAP quinasas (*DeWire y col., 2007; Ribas y col., 2007*).

2.2.2. Proteínas tipo fosducina (PhLP)

La proteína tipo fosducina (PhLP) une los dímeros *Gβγ* originados por la actividad de los agonistas sobre los GPCR (*Garzón y col., 2002; McLaughlin y col., 2002; Partridge y col., 2006*). Al menos dos isoformas de PhLP se han identificado: PhLP1 y PhLPs, que difieren en el tamaño de su amino terminal conteniendo 297 y 218 residuos respectivamente (*Miles y col., 1993*).

In vitro la PhLP1 se une con alta afinidad a los dímeros *Gβγ*, bloqueando su acción sobre los efectores celulares (*Schröder y col., 1996; Schulz y col., 1996; Thibault y col., 1997; Humrich y col.,*

2003). La fosducina se une a los dímeros $G\beta\gamma$ regulando la señalización mediada por el receptor rodopsina. Esta asociación está interrumpida por la fosforilación de la fosducina mediada por la quinasa dependiente de AMPcíclico, PKA, liberando los dímeros $G\beta\gamma$ que pueden reasociarse con la GatGDP (Lee y col., 1990, Yoshida y col., 1994; Wilkins y col., 1996). La PhLP1 presente en el SN está relacionada con la fosducina retinal. Por analogía con el papel de la fosducina en la señalización de la rodopsina, la PhLP1 se uniría a los dímeros $G\beta\gamma$ y regularía así a los GPCR.

La unión de la fosducina retinal a la proteína de unión a fosfoserinas 14-3-3 requiere fosforilación por CaMKII (Thulin y col., 2001) y esta quinasa también promueve la fosforilación de PhLP1 (Garzón y col., 2002). Una serie de trabajos han relacionado la tolerancia inducida por morfina con la activación de la CaMKII (Fan y col., 1999; Lu y col., 2000; Tang y col., 2006). Es posible que la unión de la PhLP a los dímeros $G\beta\gamma$ y a la 14-3-3 esté regulada por un mecanismo donde la CaMKII tenga un papel relevante.

3. Vía de señalización de las MAPK

Principales rutas de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK):

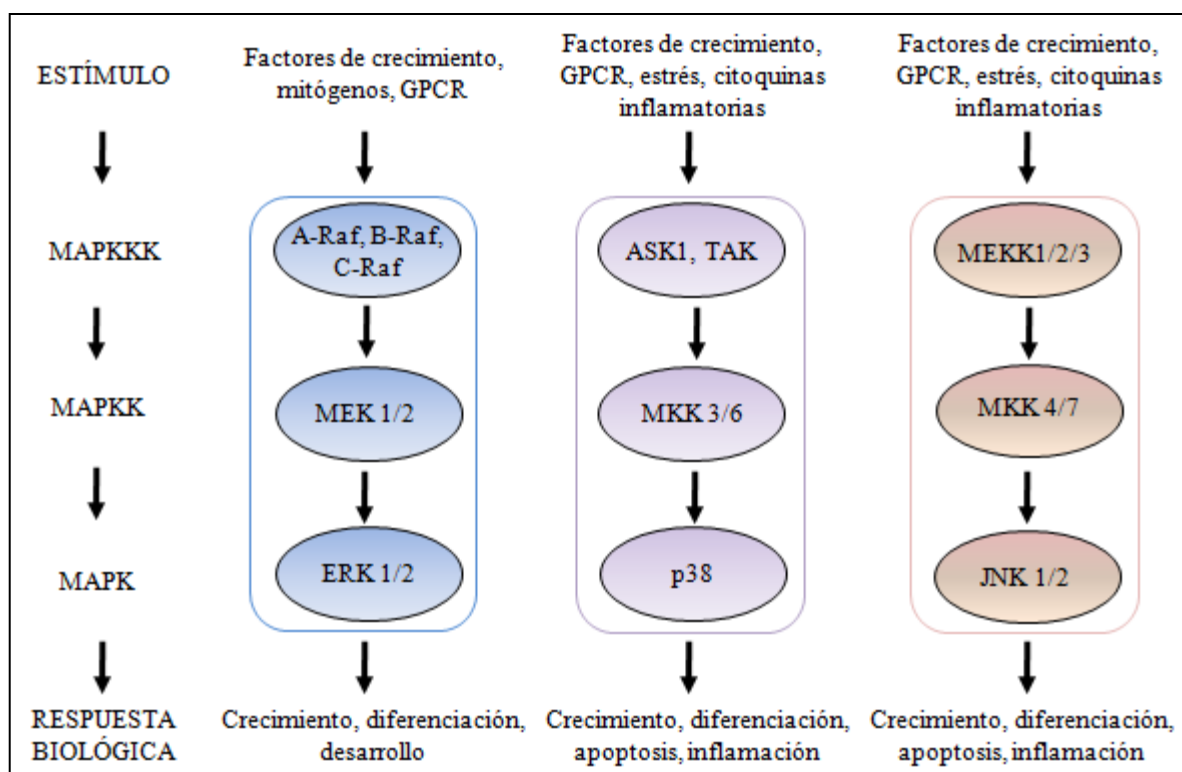


Figura 5. Principales rutas de señalización de la MAPK. Las MAPK son activadas por las quinasas de las MAPK (MAPKK), que a su vez son activadas por las quinasas de las MAPKK (MAPKKK). La propagación secuencial de las señales ocurre mediante pasos de fosforilación en respuesta a estímulos específicos. Adaptado de Haddad, 2005.

La ruta de las MAPK es una cascada de señalización que juega un papel crucial en numerosos procesos de regulación celular. También puede integrar sistemas de segundos mensajeros como el Ca^{2+} , AMPc o diacilglicerol (DAG) en regulación de funciones neurales. Existen tres vías principales de MAPK: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las quinasas Jun N-terminal (JNK), y las quinasas p38 (Figura 5). ERK1 y ERK2 son las más abundantes en neuronas (Ortiz y col., 1995).

La exposición del MOR a agonistas tanto peptídicos como no peptídicos, incluida la morfina, estimula una activación rápida y transitoria de la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

La RGS14 es un integrador de las vías de señalización de las proteínas G y MAPK (Figura 6). Se ha descrito que actúa como GAP para las subunidades Gai/o (Traver y col., 2000; Cho y col., 2000; Hollinger y col., 2001), como GDI para Gai1/i3 (Kimple y col., 2001; Mittal y Linder, 2004) y que podría ser un efector directo para las proteínas G monoméricas (Traver y col., 2000; Kiel y col., 2005; Mittal y Linder, 2006; Willard y col., 2009).

| Secuencia aminoacídica de la RGS14 de ratón | |
|---|-----|
| MPGKPKHLGVPNGRMVLAUSDGELTSTAGSQAQGEGRGSSLSIHSLSPSGPPSPFSTEEQP | 60 |
| VASWAQSFERLLQDPRGLAYFTEFLKKEFSAENVTFWKACERFQQIPASDTKQLAQEAHN | 120 |
| IYHEFLSSQALS P VNIDRQAWLSEEVLAQPRPDMFRAQQLOIFNLMKFDSYARFVKSPLY | 180 |
| QECILAEAEGRPLREPGSSHLGSPDTARKKPKLKP GKSLPLGVEELGQLPLAEGPCGRPL | 240 |
| RKSFREMTGAMNSALRRESQGS LNSSASLDLGFLAFVSSKSESHRKS LGSGESESESR | 300 |
| PGKYCCVYLPDGTASLALARPGLTIRDMLAGICEKRGLSLPDIKVYLVGNEQKALVLDQD | 360 |
| CTVLADQEVRLNRITFQLELVGLERVVRI SAKPTKRLOEALQPI LAKHGLSLDQVVLHR | 420 |
| PGEKQPM DLET PVSSVASQTLVLDTP PDAKMSEARSISPCRSQGCLPRTQT KDSHLPSS | 480 |
| SLLVEDASSSTGNRQTCDIEGLVELLN RVQSSGAHDQRGLLRKEDLVLPEFLQLPSQRP | 540 |
| GSREAPP | 547 |

Figura 6. Secuencia aminoacídica de la proteína RGS14 de ratón. La RGS14 de ratón (NP_058038) posee 547 aminoácidos lo que le confiere un peso teórico de 60 kDa. Posee un dominio RGS comprendido entre los aminoácidos 67-183. Presenta en su estructura un tándem de dominios RBD, R1 de los aminoácidos 303-374 y el R2 entre los 376-446. También posee un dominio GoLoco entre los 498-523. La secuencia entre los 237-250 corresponde a la elegida para generar el anticuerpo frente a la proteína.

Un análisis de interacción de doble-híbrido de levaduras reveló que la RGS14 mostraba una interacción selectiva con el Rap1B activado pero no con Ras (Traver y col., 2000). Experimentos *in vitro* confirmaron la unión dependiente de nucleótido de Rap1 y Rap2 a la RGS14, pero no de Ras (Traver y col., 2000, 2004; Kiel y col., 2005; Mittal y Linder, 2006). Basándose en esos resultados se propuso a la RGS14 como un efector directo del Rap *in vivo*. Estudios posteriores pusieron de

manifiesto que esta RGS es capaz de unirse tanto a los Rap como al Ras *in vitro* (Kiel y col., 2005; Willard y col., 2009). La RGS14 une y regula la localización subcelular y las actividades de H-Ras y las quinasas Raf en las células. Al activarse H-Ras RGS14 se une de forma estable al R1 RBD. La región reguladora de C-Raf se une al dominio RBD de la RGS14. H-Ras y Raf se facilitan mutuamente su unión a RGS14 (Shu y col., 2010).

3.1. Familia de los Ras

Las proteínas G monoméricas son pequeñas moléculas de 21 kDa aproximadamente. El grupo de proteínas Rap es el que más próximo se encuentra al Ras, poseen en torno al 50 % de aminoácidos idénticos, lo que les confiere una estructura tridimensional similar y muestran un dominio efector conservado a través del cual, tanto Ras como los Rap, interaccionan con los efectores. Se han identificado cinco miembros diferentes que se agrupan en dos subfamilias: Rap1, formada por Rap1A y Rap1B, poseen un 95 % de homología; Rap2, formada por Rap2A, Rap2B y Rap2C, poseen un 90 % de homología. Los miembros de la subfamilia Rap1 son 70 % homólogos con las proteínas Rap2 (Paganini y col., 2006). Los dominios necesarios para la localización subcelular y las funciones biológicas están altamente conservados entre las proteínas Rap.

El Rap1 actúa como antagonista del Ras debido a que revierte el fenotipo de fibroblastos transformados con Ras (Kitayama y col., 1989) y a que compiten por la interacción de efectores como la quinasa C-Raf. Rap se une al CRD del C-Raf con más afinidad que el Ras, excluyendo al Ras de unirse (Okada y col., 1999). El Ras activa al C-Raf iniciando la cascada de las MAPK, la unión del Rap1 no permite su activación (Herrmann y col., 1996). Sin embargo, es capaz de activar la cascada de las MAPK por una vía independiente del Ras, a través del B-Raf. El Rap2 no antagoniza los efectos del Ras aunque sí se han observado otras funciones similares a las que desempeña el Rap1 (Ohba y col., 2000; McLeod y col., 2004).

Ras y Rap, así como sus reguladores GAP y GEF, se encuentran en las sinapsis (Chen y col., 1998; Kim y col., 1998; Husi y col., 2000; Ye y col., 2000; Pak y col., 2001). Se ha descrito gran variedad de moléculas que pueden regular a las proteínas G monoméricas debido a que poseen actividad GAP, GEF o GDI. Cabe destacar los RapGAP, activadores específicos de la actividad GTPasa de los Rap1, que interaccionan con subunidades α formando complejos heteroproteicos y que relacionan ambas familias de proteínas G (Meng y col., 1999; Mochizuki y col., 1999; Jordan y col., 1999). También son interesantes los CalDAG-GEF, reguladores GEF activados con Ca^{2+} y/o DAG que establecen una relación entre receptores acoplados a proteínas G, el Rap1 y la cascada de las ERK vía B-Raf (Guo y col., 2001).

3.2. Familia de los Raf

Las proteínas Raf son serina/treonina quinasa. Tienen una estructura conservada formada por las regiones CR1 y CR2 en el Nt y la región CR3, que contiene el dominio quinasa en el Ct. El CR1 está constituido por dos módulos distintos: un dominio RBD, que une Ras y Rap; y un dominio rico en cisteína (CRD, *Cysteine rich domain*) formado por dos dedos de zinc. La unión del Ras o el Rap en GTP se establece a través del RBD, unión de alta afinidad, y del CRD, de baja afinidad pero necesario para la activación completa de la quinasa (Okada y col., 1999). Se han descrito tres isoformas: A-Raf, de 68 kDa es la más pequeña, aparece en el tracto urogenital; B-Raf, presenta variantes de 75 a 100 kDa debido a procesos de lectura alternativa, se localiza en testículos y tejido neural; C-Raf, de 72-74 kDa es ubicua. B-Raf y C-Raf se expresan en cerebro, en neuronas (Morice y col., 1999) (Figura 7).

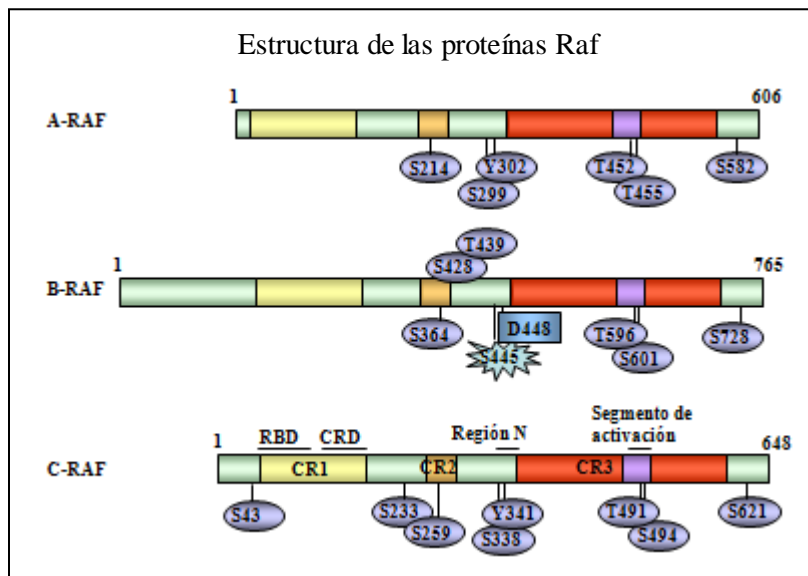


Figura 7. Estructura de las proteínas Raf. Las isoformas A-Raf, B-Raf y C-Raf presentan tres regiones conservadas: CR1 (amarillo), CR2 (naranja) y CR3 (rojo). Los aminoácidos en círculos representan los sitios de fosforilación conocidos. En la región N del B-Raf la tirosina conservada en A-Raf y C-Raf es sustituida por un aspártico (D448) y la serina en la posición 445 está constitutivamente fosforilada. Adaptado de Wellbrock y col., 2004.

Los Raf forman parte de una cascada de señalización que traduce las señales de la superficie celular hasta el núcleo. Las proteínas de familia de Ras activadas se unen al Raf a través del RBD y del CRD y lo traslocan a la membrana. El Raf activo fosforila en dos serinas en el segmento de activación de las quinasa MEK1 y MEK2 (Ser217 y Ser221 en la MEK1) y éstas a su vez a las MAPK/ERK ERK1 y ERK2 en treoninas y tirosinas (Thr202/Tyr204 en ERK1).

Estas quinasas poseen una regulación compleja que se refleja por la presencia de numerosos sitios de fosforilación distribuidos en la proteína. El B-Raf tiene tres sitios de fosforilación que poseen funciones similares a los del C-Raf: Ser728 permite su unión a la proteína de anclaje 14-3-3; Thr598 y Ser601 son esenciales para su activación. La regulación mediada por la región N, subdominio amino-terminal del CR3 importante en la actividad por su carga eléctrica, difiere en los distintos Raf. El B-Raf posee en esta zona una carga negativa constante ya que la tirosina conservada en A-Raf (Tyr302) y C-Raf (Tyr341) es sustituida por un aspártico (Asp448) y la serina en la posición 445 está constitutivamente fosforilada. Estas variaciones le confieren una actividad basal elevada comparada con el C-Raf. El B-Raf sólo necesitaría la unión del Ras para su reclutamiento a la membrana y su activación. Aunque todos los Raf pueden activar tanto a MEK1 como MEK2, B-Raf se une y fosforila a las MEK de un modo más eficiente que los otros (*Wellbrock y col., 2004*).

El reclutamiento inicial de ERK como respuesta a la estimulación opioide puede ser la clave para iniciar la transducción de señales al núcleo así como la desensibilización del MOR. La participación de esta cascada en la desensibilización podría deberse a: fosforilación directa del receptor por ERK, aunque *in vitro* el opioide no es buen sustrato de la quinasa (*Schmidt y col., 2000*); interacción directa/indirecta de la vía de las ERK con las GRK2 o a otras quinasas cuyo sustrato pueda ser el receptor; o a un desacoplamiento de las subunidades $G\alpha$ donde las proteínas RGS estarían implicadas (*Polakiewicz y col., 1998*).

Se ha observado que la administración aguda de morfina en queratinocitos estimula la actividad de ERK que parece dependiente de CaMKII y PKC (*Schmidt y col., 2000*). La unión de calmodulina (CaM) al receptor MOR, parcialmente independiente de Ca^{2+} , iniciaría la señalización a la vía de las ERK en astrocitos (*Belcheva y col., 2005*) El tratamiento prolongado de morfina en células de neuroblastoma sin embargo reduce los niveles de ERK fosforilada y por tanto activa (*Bilecki y col., 2005*). En cultivos neuronales de cortezas embrionarias de ratón se ha visto una relación entre los niveles de receptor fosforilado y la actividad ERK (*Schulz y col., 2004*). El tratamiento con morfina en cultivos con el receptor MOR *wild type* estimula la actividad de ERK. Un receptor mutado que no permite ser fosforilado tras la activación de morfina no altera la actividad de ERK (*Schulz y col., 2004*). En HEK-293, el tratamiento con inhibidores específicos de ERK1/2 o de MEK1/2 reduce tanto la fosforilación como la desensibilización del receptor MOR inducidas por agonistas opioides (*Schmidt y col., 2000*).

4. Receptores de glutamato

La adicción a las drogas se ha considerado como una adaptación neuronal donde se alteran las funciones de circuitos neuronales que incluyen cambios en la plasticidad sináptica (*Zhang y col., 1998; Robbins y Everitt, 2002; Nestler, 2001, 2004; Bao y col., 2007*). El tráfico de receptores

AMPA promovida por la actividad del NMDAR desempeña un papel clave en la plasticidad sináptica (*Bredt y Nicoll, 2003*).

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante de cerebro y médula espinal. Los receptores de glutamato (GluR) pueden ser metabotrópicos, un grupo diverso de GPCR que está unido a múltiples sistemas de segundos mensajeros regulando la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal, e ionotrópicos, que constituyen canales iónicos dependientes de ligando y median las formas rápidas de transmisión sináptica excitatoria. Los receptores ionotrópicos se clasifican según sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas en receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), de kainato y de N-metil-D-aspartato (NMDA) (*Nong y col., 2004*).

El subtipo de receptores de glutamato NMDAR comprende canales de cationes no selectivos y presenta un bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje. A diferencia del AMPAR y del receptor de kainato, el NMDAR también es permeable al Ca^{2+} , como resultado su activación promueve el aumento de Ca^{2+} intracelular en las células neuronales (*Revisado por Haddad, 2005*). Estos receptores son tetrameros que constituyen canales iónicos dependientes de ligando y que interactúan con proteínas intracelulares (*Narita y col., 2005*). Están compuestos por subunidades NR1, NR2 (A, B, C, D) y NR3 (A, B). La formación de canales NMDA funcionales requiere la combinación de dos subunidades NR1, subunidad esencial para la formación del canal y, al menos, una subunidad NR2 (*Mori y Mishina, 1995*). La presencia de una subunidad NR3 disminuye la permeabilidad de Ca^{2+} y disminuye la sensibilidad de Mg^{2+} . El Zn^{2+} es un inhibidor del canal tanto dependiente como independiente de voltaje. Las subunidades NR1 y NR3 unen glicina y las NR2 unen glutamato (*Furukawa y col., 2005; Yao y Mayer, 2006*). La glicina es un coagonista esencial para la activación del NMDAR (*Nong y col., 2004*).

Los AMPAR son heterodímeros formados por subunidades GluR1-R4. La presencia de la subunidad GluR2 va a determinar la permeabilidad del canal al Ca^{2+} . Esta subunidad sufre una modificación post-transcripcional que incluye en la secuencia una glutamina (Q) o una arginina (R). La presencia del aminoácido R, cargado positivamente, en esa posición no permite el flujo del Ca^{2+} . La mayoría de las subunidades GluR2 en el SNC son GluR2(R) (*Kim y col., 2001*). Se ha demostrado que los receptores de AMPA en las sinapsis glutamatérgicas, median la transmisión de baja frecuencia y están implicados en la expresión de la potenciación a largo plazo (LTP-*long term potentiation*) y la depresión a largo plazo (LTD-*long-term depression*). La fosforilación de los AMPAR puede regular la localización del canal, la conductancia y la frecuencia de apertura. La subunidad GluR1 tiene cuatro sitios conocidos de fosforilación en las serinas Ser818, Ser831, Ser845 y la treonina Thr840. La Ser818 es fosforilada por PKC y es necesaria para la LTP (*Boehm y col., 2006*). La Ser831 es fosforilada por la CaMKII durante LTP lo que facilita la liberación de los AMPAR que contienen la GluR1 a la sinapsis (*Hayashi y col., 2000*) y aumenta la conductancia del canal (*Derkach y col., 1999*).

La PKA fosforila la Ser845 lo que aumenta la frecuencia de apertura del canal (*Banke y col., 2000*). La defosforilación de la Thr840 por calcineurina promovida por la actividad de NMDAR está implicada en LTD (*Delgado y col., 2007*).

4.1. Cascada del NMDA/óxido nítrico

Existen numerosas evidencias que muestran una regulación cruzada entre los GPCR y la cascada del NMDA/óxido nítrico (NO). La activación de receptores NMDA, y así también de la CaMKII, está implicada en la desensibilización a morfina (*Trujillo y Akil, 1991, Elliott y col., 1994; Garzón y col., 2008*).

La actividad del NMDAR aumenta el Ca^{2+} intracelular en la neurona post-sináptica. Ese Ca^{2+} se une a CaM, se activa la calcineurina que defosforila a la nNOS y la activa estimulando la producción de NO (*Dawson y col., 1991; Garthwaite y col., 1989; Kiedrowski y col., 1992*). El NO es sintetizado a partir de L-arginina por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Hay tres isoformas de la NOS: tipo I, nNOS (neuronal); tipo II, iNOS (inducible); tipo III, eNOS (endotelial). Estas enzimas poseen sitios de unión a calmodulina (CaM), NADPH, FAD y FMN y requieren tetrahidrobiopterina para su actividad catalítica. Cada NOS cataliza los cinco pasos de oxidación de la L-arginina para generar el NO, con la citrulina como producto intermedio. El tipo I, nNOS, es la isoforma predominante en el SNC, posee en su Nt un dominio PDZ que le permite unirse a otras proteínas; se expresa constitutivamente pero requiere la estimulación de la vía Ca^{2+} -CaM para su activación.

La producción de NO lleva a la liberación de glutamato en las neuronas próximas (*Fedele y Raiteri, 1999*), aumentando la actividad del NMDAR y de otros receptores de glutamato. El NO participa en la regulación de la presión sanguínea, neurotransmisión, inmunidad y funciones cardiovasculares. Los mecanismos celulares que llevan a la plasticidad sináptica mediada por los NMDAR parecen incluir la vía del NO (*Izumi y col., 1992*) y serinas fosfatasa como la calcineurina (*Kato y col., 1999*). También se ha visto que el NO activa a la PLC δ (*Shimohama y col., 1995*) que produciría IP₃ y DAG, que a su vez activaría a la PKC (*Llansola y col., 2000*). El NO puede activar directamente a Ras (*Yun y col., 1998; Brennan y col., 2003*) que iniciaría la cascada de las MAPK. Ras tiene una cisteína crítica, Cys118 (*Lander y col., 1997*), que puede ser un sitio potencial de modulación redox por el NO (*Stamler y col., 1997*).

El antagonismo del NMDA aumenta los efectos analgésicos de la morfina (*Bernardi y col., 1996; Taniguchi y col., 1997; Boyce y col., 1999*). Existe una extensa bibliografía que demuestra que la inhibición de la enzima NOS o el uso de antagonistas del NMDAR puede atenuar la tolerancia y la dependencia opioide (*Marek y col., 1991; Trujillo y Akil, 1991; Kolesnikov y col., 1993; Elliott y col., 1994*). En PAG agonistas MOR potencian la actividad del NMDAR (*Heinricher y col., 2001; Kow y*

col., 2002). La distribución de ambos receptores es similar en ciertas regiones del SNC como el PAG, donde co-localizan (Gracy y col., 1997; Wang y col., 1999; Commons y col., 1999, Huang y col., 2000).

4.2. Plasticidad sináptica

La eficiencia sináptica está regulada por una maquinaria molecular compleja que se localiza en la parte citosólica de la membrana post-sináptica, lo que se conoce como *post-synaptic density* (PSD). La PSD está compuesta por proteínas de anclaje y señalización implicadas en la transducción de señales y en la función sináptica.

El tráfico de receptores AMPAR es uno de los mecanismos principales en los procesos de plasticidad postsináptica (Malinow y Malenka, 2002). El modelo con el que se trabaja es que la LTP dependiente de NMDAR está mediada por la inserción en la membrana y la liberación sináptica de las subunidades GluR1 gracias a la actividad de la CaMKII y la vía Ras-ERK (Hayashi y col., 2000; Passafaro y col., 2001; Shi y col., 2001; Zhu y col., 2002). Por otro lado, la LTD sería el resultado de la retirada de la sinapsis de los AMPAR debido al aumento de la endocitosis de las subunidades GluR2/3 (Beattie y col., 2000; Lee y col., 2002, 2004; Zhu y col., 2002).

Los receptores NMDA juegan un papel importante en la función sináptica. Dependiendo de cómo son activados inducirían LTP, LTD o depotenciación de la LTP de la señalización sináptica (Malenka y Bear, 2004). La LTP representa una correlación celular del aprendizaje y la memoria, así como el desarrollo del dolor crónico (Malenka y Nicoll, 1999; Ikeda y col., 2003).

La activación del NMDAR y, por lo tanto, el aumento de Ca^{2+} intracelular son necesarios para la inducción de LTP. Están asociados con el aumento en la fosforilación de subunidades NR2 vía quinasas de la familia de las Src. La fosforilación en tirosinas de los NR2A y NR2B ocurre vía Fyn y Src, y tiene como resultado la potenciación de la actividad del canal (Rostas y col., 1996; Yu y col., 1997; Abe y col., 2005). Esta fosforilación está modulada por mecanismos que incluyen a la PKC (Lu y col., 1999).

La PKC es una enzima clave que regula tanto la función pre como la postsináptica, la síntesis y liberación de neurotransmisores, y la regulación de receptores (Narita y col., 2001). Existen 11 isoenzimas de PKC, agrupadas en tres familias: *c* (clásicas: α , β I, β II, γ); *n* (noveles: δ , ϵ , η , θ , μ) y *a* (atípicas: ζ , λ). Todas son monómeros de una estructura lineal, con peso molecular entre 68 y 84 kDa que presentan un dominio regulador, en la región Nt y otro dominio catalítico en el Ct (Figura 8). En su estructura se han identificado cuatro regiones de secuencia constante: C1 y C2 ubicadas en el dominio regulador y C3 y C4 en el catalítico. Las regiones C3 y C4 están presentes en todas las

isoenzimas y corresponden a los lugares de unión del ATP y la proteína sustrato, respectivamente. La región C2 sólo está presente en las PKC α y es un dominio de unión de Ca²⁺ y fosfolípidos. La región C1, presente en las isoenzimas PKC α y PKC δ , contiene motivos ricos en cisteínas que pueden unir cuatro átomos de Zn²⁺ y que constituyen el lugar de unión del DAG, así como una secuencia pseudosustrato que podría bloquear el centro catalítico de la PKC en ausencia de estimulación y liberarse cuando la enzima se activa (Newton, 2001).

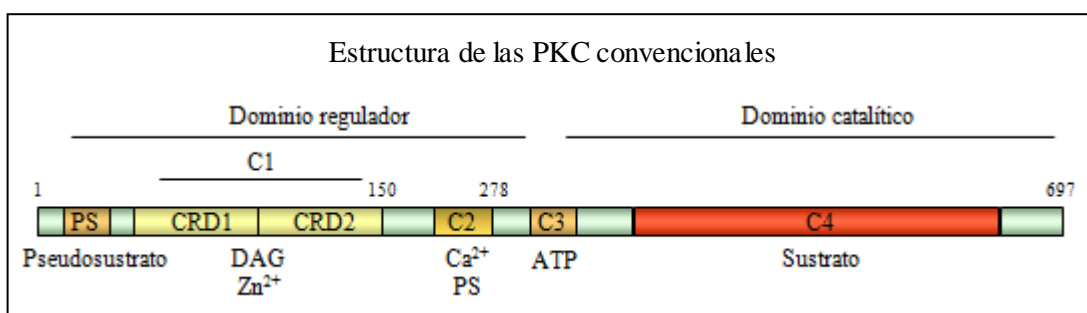


Figura 8. Esquema de la estructura primaria de las isoformas de las proteínas quinasa C convencionales α , β , γ . Las zonas C1-C4 son las regiones conservadas de la proteína. El dominio regulador está formado por una secuencia PS que reconoce a pseudosustratos; la región C1 constituida por un tándem de dos dominios ricos en cisteína (CRD1 y CRD2) que unen DAG y cuatro átomos de Zn²⁺; y el dominio C2 que une fosfatidilserina (PS) y Ca²⁺. El dominio catalítico consta de la región C3 de unión a ATP y el C4 que es el dominio quinasa al que se le une el sustrato. (La posición de los aminoácidos se corresponde con la PKC γ humana, AAK13533). Adaptado de Tan y Parker, 2003.

La PKC fosforila directamente el NMDAR (Tingley y col., 1993, 1997; Zukin y Bennett, 1995; Leonard y Hell, 1997). La activación de PKC se ha relacionado con el aumento de las corrientes en los receptores NMDA (Chen y Huang, 1992; Kelso y col., 1992; Zukin y Bennet, 1995). Se ha propuesto que los opioides mu son capaces de producir una traslocación prolongada de PKC a la membrana (Narita y col, 1994). El paso de la PKC a la membrana se considera como un indicador de su activación (Nishizuka, 1995).

La quinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaMKII) es una enzima esencial para la regulación de la sinapsis glutamatérgica, y la LTP requiere su activación (Bliss y col., 2003; Lisman y col., 2002). Tras la activación, la CaMKII puede traslocarse a la sinapsis (Otmakhov y col., 2004; Shen y Meyer, 1999; Strack y col., 1997) y unirse a través del dominio catalítico al Ct de la subunidad NR2 de los NMDAR (Leonard y col., 1999; Strack y col., 1997, 2000; Bayer y col., 2001; Otmakhov y col., 2004; Raveendran y col., 2009). Al unirse la quinasa se queda bloqueada en su estado activado (Bayer y col., 2001). La activación del MOR induce un aumento del Ca²⁺ citosólico y el reclutamiento de CaM para formar el complejo Ca²⁺-CaM necesario para activar a la quinasa (Schulman y col., 1992). La activación de CaMKII contribuye a la liberación de los AMPAR que contengan GluR1 a la

sinapsis. La inhibición de la CaMKII bloquea la LTP (*Bliss y col., 2003; Lisman y col., 2002*).

La PSD95 es la proteína mayoritaria de la PSD (*Hunt y col., 1996*), posee 3 dominios PDZ y un SH3. PSD95 interacciona con el NR2B (*Kornau y col., 1995*) y a través del PDZ con el PDZ de la nNOS (*Brenman y col., 1996*).

En los últimos años se ha mostrado que la cascada de las MAPK está regulada por los NMDAR (*Wang y col., 2007*) y tiene un papel clave en la función neuronal (*Kyosseva, 2004*) y en la plasticidad (*Adams y Sweatt, 2002; Sweatt, 2004*). En este sentido, la ERK se asocia con la inducción de LTP (*English y Sweatt, 1996, 1997; Bolshakov y col., 2000; Zhu y col., 2002; Anwyl, 2006; Li y col., 2006*), mientras que la p38 se la considera ligada a la inducción de LTD. Un tercer miembro de la familia, JNK, podría participar en la depotenciación (*Zhu y col., 2005*).

Por otra parte, Ras regula negativamente la actividad del canal iónico NMDAR disminuyendo el número de receptores que contienen la subunidad NR2A en la membrana sináptica. La unión de Ras al dominio catalítico de Src impide su activación y disminuye la fosforilación de NR2A y su retención en la membrana (*Thornton y col., 2003*). La PKC es un componente de la mayoría de las rutas que llevan de los GPCR a las ERK/MAPK y se ha visto que participa en los primeros pasos de la señalización de la vía opioide a las ERK (*Fukuda y col., 1996; Belcheva y col., 2001*).

Estos estímulos controlan el tráfico de los receptores AMPAR a la sinapsis, en la LTP, o fuera de ellas, en la LTD. Ras, mediante ERK 1/2, controla la liberación sináptica de las subunidades GluR1 y GluR2L, que poseen largas colas citoplasmáticas, lo que contribuye a la LTP. Rap1, mediante p38 controla la retirada de GluR2 y GluR3 dando lugar a LTD. Rap2, a través de JNK, controla la retirada sináptica de GluR1 y GluR2L participando así en la depotenciación (*Zhu y col., 2002, 2005*).

5. Sistema cannabinoide

Los estudios realizados para mejorar la terapéutica del dolor han puesto de manifiesto que los cannabinoides pueden ser útiles en el control del dolor patológico resistente a terapias opioides convencionales (*Mao y col., 2000; Mackie, 2006*). En este contexto, la administración de endocannabinoides como la anandamida, el agonista sintético [(R)-(+)-[2,3-dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil) pirrol [1, 2 ,3-de]-1,4-benzoacina-6-ilo]-1-naftalenilmetanona] (WIN55,212-2) o el componente natural Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) produce analgesia. Sin embargo, el uso clínico de los cannabinoides está limitado por los efectos secundarios que originan ya que su administración prolongada lleva al progresivo descenso de sus efectos, tolerancia analgésica, que se mantiene durante 14 días (*Sim-Selley y Martin, 2002; Sim-Selley y col., 2006*). El uso de cannabinoides contribuye al desarrollo de psicosis (*Arend y col., 2005; Moore y col., 2007*), así como cambios en la actividad

cannabinoide llevan a desórdenes de ansiedad e interfieren con el efecto de ansiolíticos (*Urigen y col., 2004*). Se sabe que los agonistas cannabinoides tienen propiedades antidepresivas y modulan el sistema serotoninérgico (*Bambico y col., 2007*).

5.1. Receptores cannabinoides

El carácter altamente lipofílico de los cannabinoides naturales dificultó durante años la identificación de receptores específicos para este tipo de sustancias. Algunos autores atribuían inicialmente los efectos farmacológicos del THC a su interacción con la membrana celular alterando sus propiedades (*Nahas y col., 2000*). A pesar de que esta teoría no puede descartarse totalmente, actualmente, se ha determinado que la mayoría de los efectos que producen los cannabinoides están mediados por receptores específicos. La implicación de un receptor que mediase la respuesta analgésica de un tratamiento con cannabinoides se caracterizó por primera vez por *Howlett, 1985*. Utilizando el cannabinoide sintético [H^3] CP-55,940 como radioligando se estableció la existencia en rata de un receptor cannabinoide (CBR) (*Devane y col., 1988*). La distribución de los sitios de unión del radioligando en cerebro se determinó por autorradiografía (*Herkenham y col., 1991*). El gen en rata de un GPCR que unía cannabinoides fue identificado por *Matsuda y colaboradores, 1990*, y se conoce como CB1R para distinguirlo de un segundo receptor cannabinoide CB2R, identificado por *Munro y colaboradores, 1993*.

Los receptores CBR pertenecen a la familia de los GPCR. Constan de un dominio Nt extracelular, un dominio Ct intracelular y en su estructura se encuentran residuos específicos como sustratos de fosforilación, de glicosilación, lugares de fijación de ligandos o de unión a proteínas G (Figura 9). El CB1R es una proteína de 419 aminoácidos lo que le confiere un peso molecular teórico de 53 kDa, aunque puede ser glicosilado en uno o dos lugares en el extremo amino dando lugar a proteínas con un peso molecular entre 58 y 63 kDa (*Song y Howlett, 1995*).

El clonaje de los receptores cannabinoides permitió identificar una serie de moléculas propuestas como sus ligandos endógenos. Son los denominados cannabinoides endógenos o endocannabinoides que, aunque son estructuralmente diferentes a los cannabinoides presentes en las preparaciones de la planta *Cannabis sativa*, forman parte de un sistema de modulación del organismo que contiene las dianas sobre las que actúan los cannabinoides vegetales. El aislamiento del primer ligando endógeno de los receptores cannabinoides se realizó a partir de un extracto lipídico de cerebro de cerdo del que se obtuvo la araquidoniletanolamina, más conocida como anandamida (*Devane y col., 1992*); y más tarde se aisló el 2-araquidonilglicerol (*Mechoulam y col., 1995*). Estos son dos de los cannabinoides endógenos mejor caracterizados, aunque recientemente también se han aislado nuevos candidatos endocannabinoides como el 2-araquidonil gliceril éter (*Hanus y col., 2001*). Estos compuestos presentan una estructura química muy diferente de la de los cannabinoides vegetales y

sintéticos, por lo que muchos efectos fisiológicos pueden diferir. Se trata de compuestos derivados de ácidos grasos polinsaturados, concretamente son etanolaminas del ácido araquidónico; compuestos muy sensibles a la hidrólisis enzimática. A esta familia de compuestos pertenecen unos derivados sintéticos más estables a la hidrólisis enzimática, entre los que encontramos la metanandamida o la ACEA (Pertwee, 1999).

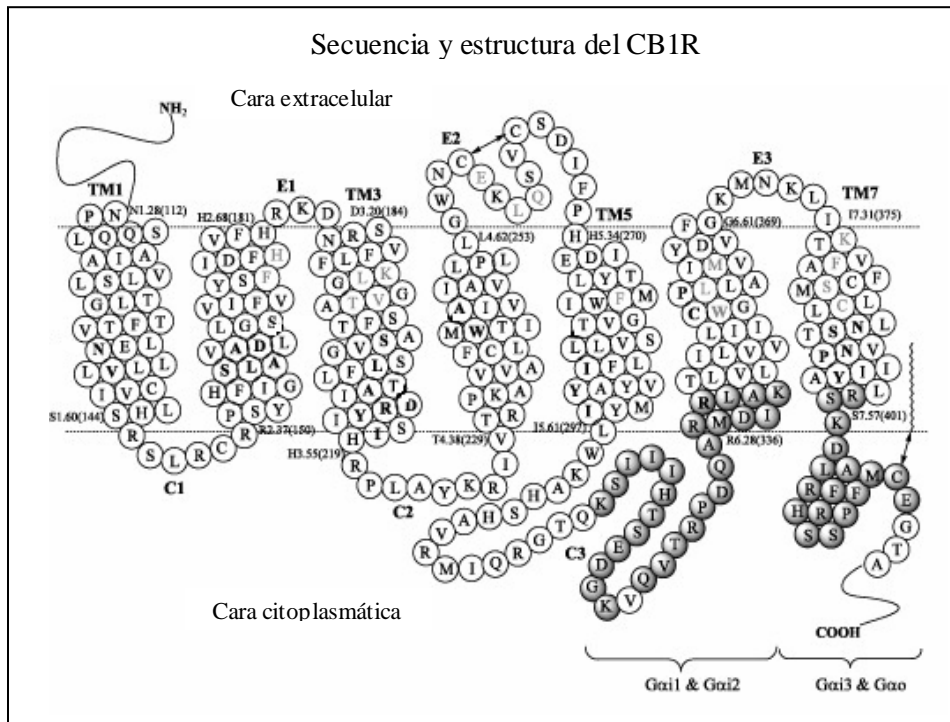


Figura 9. Secuencia aminoacídica y estructura propuesta para el receptor cannabinoide tipo 1 (CB1R). Se indican el extremo amino terminal, las regiones transmembrana TM1-TM7, los bucles extracelulares E1-E3, los bucles citosólicos C1-C3 y el extremo carboxilo terminal. En color gris se muestran las zonas de interacción con las subunidades G α . En negrita se muestran los residuos conservados. En gris claro son los residuos propuestos en la interacción con los ligandos. Adaptado de Shim y col., 2003.

Los efectos producidos por los cannabinoides están mediados principalmente por el receptor cannabinoide tipo 1 (CB1R) (Compton y col., 1993; Howlett, 2002). El CB1R es uno de los receptores más abundantes en el SNC. Se localiza en áreas del cerebro que controlan el movimiento, la coordinación, la percepción sensorial, el aprendizaje y la memoria, las emociones, la función hormonal, la temperatura corporal y la nocicepción. Esta distribución se corresponde con el perfil de cannabinoides que se encuentran en cerebelo, hipocampo y corteza cerebral (Herkenham y col., 1991; Thomas y col., 1992). A diferencia de los receptores MOR, los receptores cannabinoides no aparecen en el tallo cerebral, lo que podría explicar la ausencia de efectos letales por sobredosis de cannabis (Glass y col., 1997).

Existen muchas evidencias electrofisiológicas que sugieren la localización preferentemente presináptica de los receptores CB1, donde su activación causa inhibición de la liberación de distintos neurotransmisores (*Schlicker y Kathmann, 2001*) como el ácido γ -amino butírico (GABA) (*Katona y col., 1999; Hajos y col., 2000*) o glutamato (*Gerdeman y Lovinger, 2001*). Además el THC y otros cannabinoides se ha visto que modulan la actividad neuronal y la liberación de dopamina (*Cadogan y col., 1997; Tanda y col., 1997; Kathmann y col., 1999; Cheer y col., 2003*), noradrenalina (*Schlicker y col., 1997; Kathmann y col., 1999; Trendelenburg y col., 2000; Tzavara y col., 2001*) y serotonina (*Nakazi y col., 2000; Egashira y col., 2002*) con algunas diferencias regionales. La activación del CB1 induce mayoritariamente efectos inhibitorios en las neuronas sobre las que se localiza (*Schlicker y Kathmann, 2001*). Sin embargo también se ha visto una localización postsináptica tanto del CB1R como del CB2R (*Brusco y col., 2008; Scavone y col., 2010*) lo que les acerca a una posible regulación glutamatérgica NMDA-AMPA.

El receptor CB2R ha sido localizado principalmente en células mieloides, macrófagos y monocitos del bazo y en zonas relacionadas con el sistema inmune como el bazo y las amígdalas (*Galiegue y col., 1995; Schatz y col., 1997*). Se ha relacionado el efecto inmunomodulador de los cannabinoides con estos receptores (*Klein y col., 1998*). Algunos autores también han indicado su posible presencia en neuronas y astrocitos (*Skaper y col., 1996; Sagan y col., 1999*).

5.2. Señalización cannabinoide

La transducción de señales a través de los receptores cannabinoides CB1R y CB2R ocurre fundamentalmente a través de proteínas G del subtipo Gi/o, lo que produce una inhibición del enzima AC que da lugar a un descenso en los niveles de AMPc intracelular (*Pertwee, 1997*). Existen evidencias que muestran que el CB1R se acopla y regula a proteínas Gi/o, Gq/11 y Gz. El endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol protege a las neuronas limitando la expresión de la ciclooxigenasa-2, un efecto mediado por las proteínas Gi/o (*Zhang y Chen, 2008*). El WIN55,212-2 reduce la liberación de acetilcolina en el hipocampo a través de un mecanismo regulado por Gi/o (*Tzavara y col., 2003*); produce el aumento de calcio intracelular mediante la actividad de la Gq/11 aunque este efecto no se ha observado para otros cannabinoides como el THC o la metanandamida (*Lauckner y col., 2005; McIntosh y col., 2007*). La unión de diferentes cannabinoides al CB1R determinaría la clase de proteínas G que son activadas, lo que también se ha visto en el sistema opioide para el MOR y el DOR (*Garzón y col., 1997, 1998; Sánchez-Blázquez y col., 2001*).

El receptor CB1 modula la actividad de distintos canales iónicos: inhibición de canales de Ca^{2+} , activación de corrientes de K^+ , aumentando la conductancia del K^+ (*Pertwee, 1997; Howlett y col., 2002*). Estos efectos que se relacionan con la inhibición que producen los cannabinoides sobre la liberación de distintos neurotransmisores (*Schlicker y Kathmann, 2001*). La activación de este receptor

también provoca la estimulación de la vía de las MAPK, vía involucrada en los fenómenos proliferativos y de diferenciación (*Bouaboula y col., 1995*). En cambio, el receptor CB2 no es capaz de modificar las corrientes de los canales de Ca^{2+} y K^{+} (*Felder y col., 1995*).

Los agonistas cannabinoides protegen a las neuronas de los efectos citotóxicos de los aminoácidos excitatorios (*Shen y Thayer, 1998*) y de procesos patológicos como la isquemia (*Nagayama y col., 1999*), sucesos en los que está implicada la excitotoxicidad. Los cannabinoides endógenos también participan en neuroprotección y pueden ayudar a promover la supervivencia del tejido neural dañado (*Sinor y col., 2000; Panikashvili y col., 2001, 2005; Parmentier-Batteur y col., 2002; Marsicano y col., 2003*). La acción de los CB1R puede inhibir el flujo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (*Mackie y Hille, 1992*). Sus efectos anti-excitotóxicos pueden deberse en parte al reducir la liberación de neurotransmisores dependientes de Ca^{2+} como el glutamato aunque su presencia postsináptica les permitiría la regulación de los NMDAR. El papel protector de los cannabinoides se da por un mecanismo dependiente de *n*NOS y PKA (*Hillard y col., 1999*). Los endocannabinoides activan el CB1R reduciendo la liberación sináptica de GABA y glicina participando en circuitos de control del dolor (*Pernía-Andrade y col., 2009*).

El uso clínico de los cannabinoides está limitado debido a efectos secundarios como sedación, efectos psicotrópicos, deterioro de la memoria temporal y que la analgesia disminuye progresivamente durante el uso repetido. La administración crónica de cannabinoides incluidos el WIN55,212-2, THC y CP55,940 produce una rápida tolerancia (*Abood y Martin, 1992; Martin y col., 1994; Rodríguez de Fonseca y col., 1994; Fan y col., 1996; Sim-Selley y Martin, 2002; De Vry y col., 2004; Sim-Selley y col., 2006*). Un punto clave en el proceso es el estado de activación de los receptores así como su número en la superficie celular. En este sentido se ha visto que los agonistas cannabinoides producen una rápida internalización del receptor CB1R (*Hsieh y col., 1999*) y el desacoplamiento del CB1R de las proteínas G (*Sim y col., 1996*). La fosforilación de las serinas Ser426 y Ser430 de la cola citoplasmática del CB1R puede ser el mecanismo molecular de la desensibilización homóloga del CB1R aunque no estaría implicada en la internalización (*Jin y col., 1999*). Los residuos 460-464 se requieren para su internalización, que ocurre vía clatrina y es dependiente de dinamina (*Hsieh y col., 1999*). En este segmento se han identificado dos sitios potenciales de fosforilación la Thr461 y la Ser463.

Aunque los cannabinoides actúan de forma independiente de los opioides para producir efectos antinociceptivos, parece que ciertos circuitos de señalización están implicados en ambas formas de analgesia (*Meng y col., 1998; Maldonado y Valverde, 2003; Viganò y col., 2005*).

Antecedentes y Objetivos

El trabajo de investigación del *Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Cajal* se ha centrado en el estudio del mecanismo de transducción asociado a los receptores opioides MOR y DOR. Se ha puesto de manifiesto la relación entre la actividad intrínseca de los agonistas del MOR y los complejos constituidos por el receptor y las diferentes proteínas G que regula. Se propone que la perturbación estructural que un determinado agonista provoca al unirse al receptor condiciona los tipos de proteínas G que pueden ser activadas.

La administración crónica de opiáceos produce una serie de modificaciones que originan el desarrollo de tolerancia a la mayor parte de sus efectos farmacológicos. La investigación de diversos grupos ha demostrado que las pérdidas de eficacia de algunos agonistas están inicialmente mediadas por cambios en la maquinaria de señalización asociada a los receptores. Tras una dosis aguda y suficiente de agonista para generar taquifilaxia y/o tolerancia a corto-medio plazo se produce una disminución temporal de las proteínas G susceptibles de regulación receptoral y, por tanto, un descenso de los efectos agonistas (Garzón y col., 2001; Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001; Garzón y col., 2003). El conjunto de estos trabajos ha demostrado que la potencia analgésica y los efectos adictivos de los opioides dependen tanto del correcto funcionamiento de sus receptores específicos, como del estado funcional de las proteínas G.

Además de los mecanismos clásicos de desensibilización del receptor opioide MOR se ha descrito que este proceso puede deberse a diferentes mecanismos moleculares en los que participan diferentes rutas de señalización (Bailey y col., 2006; Johnson y col., 2006). Distintos estudios han revelado la importancia de la vía de las MAPK y la cascada del NMDA/óxido nítrico en procesos de desensibilización del receptor opioide MOR (Trujillo y Akil., 1991; Elliot y col., 1994; Schmidt y col., 2000; Bohn y col., 2002).

La presente Tesis Doctoral pretende aportar información sobre la desensibilización opioide y la implicación de las cascadas de la MAPK y la NMDAR/NO en la señalización mediada por el receptor opioide μ , así como hacer extensivo este estudio a otros sistemas acoplados a proteínas G como es el cannabinoide. Los objetivos concretos del trabajo se pueden resumir en los siguientes apartados:

- 1. Analizar los diferentes mecanismos de desensibilización del MOR en PAG de ratón tras diferentes tratamientos con morfina y DAMGO: fosforilación, internalización, transferencia de subunidades $G\alpha$.** Después de diferentes protocolos de administración de los agonistas se estudiará mediante la técnica de inmunoprecipitación el estado de fosforilación del receptor opioide μ , su presencia en los compartimentos citosólicos y en la membrana celular así como su asociación con las subunidades $G\alpha$ de las proteínas G.

2. **Caracterizar a la familia de proteínas R12 en el sistema nervioso de ratón, en especial a la RGS14, que debido a su estructura y capacidad de interacción con proteínas G puede actuar como elemento integrador de los sistemas MOR-MAPK.** Con este fin se diseñará *primers* frente a la secuencia del ARNm de estas proteínas estudiando su expresión mediante la técnica de PCR cuantitativa y se realizará ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo específico que reconoce a estas RGS. También se clonará la proteína RGS14 y los extremos carboxilo-terminal de los receptores MOR y CB1R para estudiar su interacción
3. **Determinar la influencia de la estimulación de los receptores opioides por morfina en la activación de la cascada de las MAPK en el SN de ratón. Estudiar el papel de la RGS14 en esa activación.** En esta parte del trabajo se analizará el estado de activación de diferentes moléculas implicadas en la cascada de las MAPK y, el efecto de la reducción de la expresión de la RGS14 mediante oligonucleótidos antisentido (ODN) en esa activación.
4. **Analizar el tráfico de receptores NMDAR y AMPAR en la membrana sinaptosomal de PAG de ratón inducido por morfina.** Para ello se detectarán las diferentes subunidades de los receptores NMDAR y AMPAR en la fracción de membrana de PAG después de la administración de una dosis aguda de morfina en ratones *naïve* y en *knockdown* para la RGS14.
5. **Estudiar la activación de las quinasas CaMKII y PKC tras la estimulación del receptor MOR. Papel del módulo HINT1/RGSZ.** Tras la administración de morfina y DAMGO se estudiará la activación de las quinasas CaMKII y PKC. Realizaremos ensayos *in vitro* en presencia de zinc, quelantes de iones bivalentes y donantes de óxido nítrico para determinar su relevancia en el reclutamiento de la PKC al receptor opioide μ . Analizaremos el módulo HINT/RGSZ asociado al receptor opioide μ y su implicación en la señalización mediada por este receptor.
6. **Caracterizar el sistema cannabinoide: analgesia, tolerancia y mecanismos de desensibilización y señalización.** En este último apartado se establecen las posibles correlaciones entre el sistema cannabinoide y el opioide. Se estudiará la analgesia y la tolerancia debidas a diferentes agonistas cannabinoides. Mediante la técnica de inmunoprecipitación se estudiarán las moléculas de señalización asociadas al receptor cannabinoide tipo 1 así como su internalización tras la administración de los agonistas.

Resultados

1. Estudio comparativo de morfina/DAMGO: analgesia y tolerancia

1.1. Estudios funcionales

El alivio del dolor intenso es el efecto más positivo de los opioides. La capacidad de estas sustancias de producir antinocicepción es un parámetro claro y fácilmente cuantificable que nos permite detectar cambios en la potencia y eficacia de los agonistas. La estructura cerebral seleccionada para nuestro estudio, sustancia gris periacueductal (PAG), tiene un papel fundamental mediando los efectos analgésicos supraespinales de los opioides administrados vía intracerebroventricular (icv) (*Yaksh y col., 1976*). Los MOR del PAG juegan un papel clave en los efectos antinociceptivos de los opioides administrados tanto vía icv como por vía sistémica (*Hoffmeister y Kroneberg, 1966; Yaksh y col., 1976; Henricher y col., 1992*). Tras la administración icv, los opioides tienen acceso a las áreas periventriculares implicadas en el control de la información pro-nociceptiva ascendente. En la primera fase del estudio analizamos la respuesta analgésica evocada por los opioides: morfina y DAMGO. Para medir el efecto antinociceptivo supraespinal producido por ambos agonistas empleamos el test de *tail-flick*, consiste en la aplicación de un estímulo térmico en la cola del ratón y se evalúa la respuesta al dolor midiendo el tiempo de la retirada de la cola. Esta respuesta supone un reflejo espinal que está bajo el control del tallo cerebral (*D'Amour y Smith, 1941; Nott, 1968; Vyklicky, 1984*).

1.1.1. Administración aguda de opioides: desarrollo de tolerancia aguda a una dosis icv de morfina/DAMGO en el ratón.

La administración icv de los opioides produce un efecto antinociceptivo dependiente del tiempo y de la dosis (Figura 10). En primer lugar se analizó el curso temporal del efecto analgésico producido por dos dosis de morfina: 3 nmol y 10 nmol/ratón. Las dos dosis del agonista alcanzaron su máximo a los 30 minutos de la inyección del opioide, un 40 % del efecto analgésico máximo medido en este test (EAM) para la dosis de 3 nmol y un 80 % del EAM para la dosis de 10 nmol/ratón de morfina. La analgesia cesó 120 minutos después de la administración de 10 nmol de morfina o pasados 90 minutos tras la dosis de 3 nmol. En el caso del DAMGO analizamos las dosis de 30 pmol y 100 pmol/ratón detectándose en este test efectos analgésicos comparables a la morfina 3 nmol y 10 nmol, es decir, sobre un EAM del 50 % y 80 % respectivamente, aunque este pico se alcanzó a los 15 minutos tras la inyección y a los 60 minutos ya no se detectó analgesia.

La administración repetida de estas sustancias conduce a la desensibilización de receptores MOR. La inducción de tolerancia tras una dosis adecuada de un opioide es un fenómeno dependiente del tiempo y que se desarrolla tras la primera exposición del animal a los opioides (*Huidobro y col., 1978*). Se ha observado el fenómeno de tolerancia al opioide como una disminución de la potencia analgésica evocada por la morfina en animales que han recibido dos dosis agudas del opioide

separadas 24 horas entre sí, respecto a animales a los que sólo se les administró una (Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001; Garzón y col., 2004).

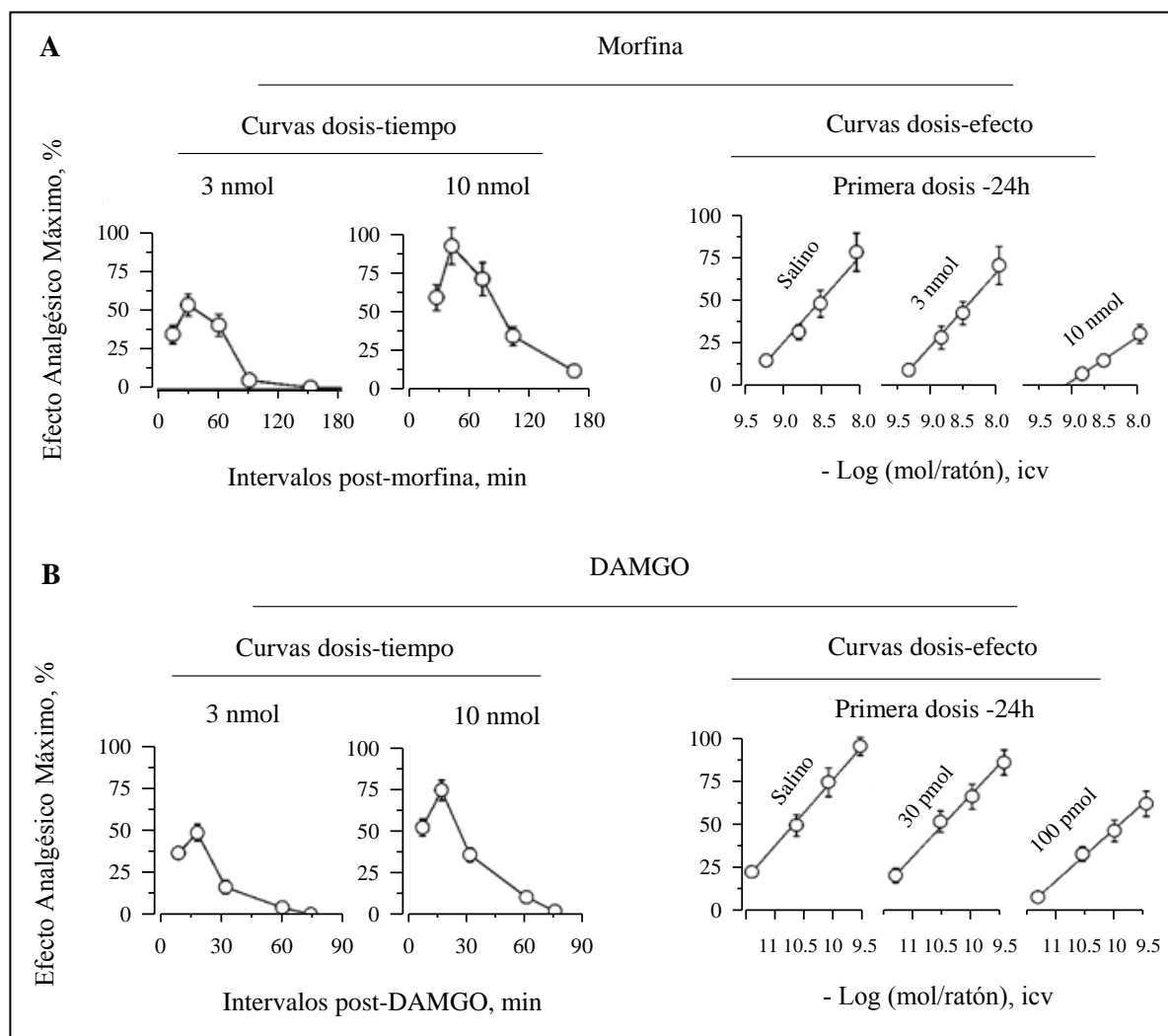


Figura 10. Analgesia y tolerancia inducida por morfina y DAMGO. **A.** Curvas dosis-efecto obtenidas tras la administración de una dosis inicial 3 y 10 nmol de morfina. La tolerancia a una única dosis de opioide se estudió 24 horas después de que ratones recibieran la primera dosis del opioide similar a la segunda, se les administraron dosis de 10, 3, 1 o 0,3 nmol/ratón de morfina (expresadas como $-\text{Log}(\text{moles})$) y se determinó la analgesia 30 minutos después empleando el test de *tail-flick*. **B.** Curvas dosis-efecto obtenidas tras la administración de una dosis inicial 30 y 100 pmol de DAMGO. La tolerancia a una única dosis de opioide se estudió 24 horas después de que ratones recibieran la primera dosis. Se les administraron dosis de 300, 100, 30 o 10 pmol/ratón de DAMGO (expresadas como $-\text{Log}(\text{moles})$). Se inyectaron los agonistas vía icv a los ratones y se determinó la analgesia 30 minutos después empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como un porcentaje del efecto analgésico máximo (% EAM) tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

Siguiendo este modelo se obtuvo sólo un 40 % del EAM para una dosis de 10 nmol de morfina cuando se volvió a estudiar la analgesia en ratones que ya habían recibido la primera dosis 24 horas

antes. Cuando se administró una dosis de 3 nmol no se observó esa desensibilización, ni cuando la segunda dosis fue de 10 nmol/ratón. Al igual que para la morfina, la dosis más baja de DAMGO, 30 pmol, no produjo tolerancia, mientras que la dosis de 100 pmol de DAMGO sí la produjo, aunque mucho menor que la observada para la morfina.

Con el fin de determinar el intervalo entre dosis de opioides requerido para detectar la tolerancia se repitió la administración de una dosis de morfina de 10 nmol similar a la inicial pasadas 3, 6 o 24 horas de la primera inyección (Figura 11). En este sentido, cuando se volvió a inyectar a las 3 horas una dosis del opioide, el efecto analgésico observado fue comparable al primero (Sánchez-Blázquez y col., 2005). Sin embargo, cuando la segunda administración se realizó pasadas 6 horas o 24 horas de la primera dosis se observó una analgesia mucho menor. La potencia antinociceptiva de la dosis inicial de morfina se recupera a los 4 o 5 días. Estas observaciones sugerirían que se requiere la síntesis de MOR para recuperarse de la tolerancia que sigue a la administración aguda de morfina. En el caso del DAMGO, la repetición de una dosis de 200 pmol a las 3 horas o a las 6 horas tras la administración inicial sigue produciendo el mismo efecto analgésico, sin embargo sí se observa un moderado descenso en la analgesia cuando el intervalo entre dosis es de 24 horas.

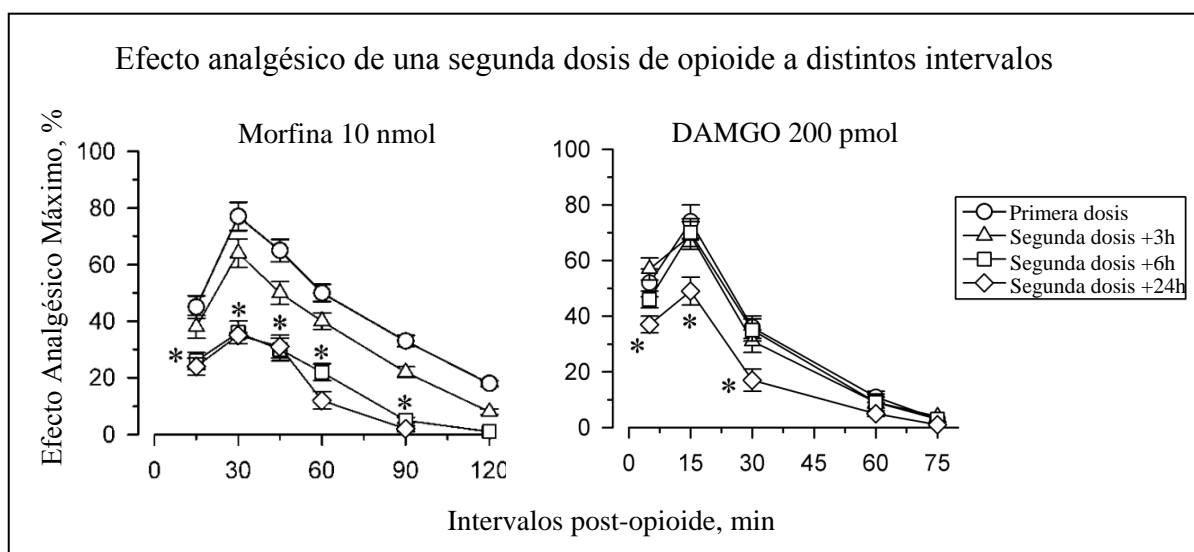


Figura 11. Analgesia inducida por los agonistas opioides morfina y DAMGO. Curvas dosis-efecto obtenidas tras la administración inicial de 10 nmol/ratón de morfina y 200 pmol/ratón de DAMGO y una segunda dosis similar a la primera a las 3, 6 y 24 horas después de que ratones recibieran la inicial. Se inyectaron los agonistas vía icv a los ratones y se determinó la analgesia a varios intervalos empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como un % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Estadísticamente diferente del grupo control (primera dosis) ANOVA-Keuls-Student test, $P < 0,05$.

1.2. Estudios moleculares

1.2.1. Desensibilización del MOR por fosforilación/internalización

Uno de los mecanismos de desensibilización que comparten los GPCR es la fosforilación de los residuos intracelulares del receptor seguido de su internalización (*Lefkowitz y col., 1998*). En el caso del receptor opioide mu es un proceso dependiente de agonista. En este sentido se sabe que agonistas con alta capacidad de unión incrementan la probabilidad de la inactivación de GPCRs por GRKs, puesto que estas quinasas actúan solamente sobre receptores ocupados por agonistas (*Pitcher y col., 1998*). Opioides como la etorfina y DAMGO son capaces de producir fosforilación e internalización (*Keith y col., 1998, Trafton y col., 2000*), sin embargo, la activación por morfina no promueve que los MOR se fosforilen o internalicen con participación de β -arrestina-dinamina (*Arden y col., 1995; Capeyrou y col., 1997; Zhang y col., 1998; Schmidt y col., 2000; Zaki y col., 2000*).

Este mecanismo de fosforilación e internalización ha sido ampliamente documentado para los receptores opioides en sistemas celulares. Para comprobar si también ocurría a nivel de SNC se analizó la fosforilación del MOR así como su patrón de precipitación en PAG de ratones sacrificados a diferentes intervalos después de una dosis del agonista, morfina o DAMGO, siguiendo diferentes protocolos de administración.

En el estudio se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo dirigido frente al segundo bucle extracelular del receptor opioide murino (Materiales y métodos 1.2). La inmunodetección del MOR en el PAG revela una serie de isoformas que pueden estar producidas por la lectura alternativa del gen (*Pasternak, 2001*) y también por la *N*-glicosilación (*Garzón y col., 2005*). Estos receptores son observados en bandas correspondientes a pesos de 50-65 KDa, 80-100 KDa así como en otras bandas minoritarias de pesos moleculares superiores (Figura 12).

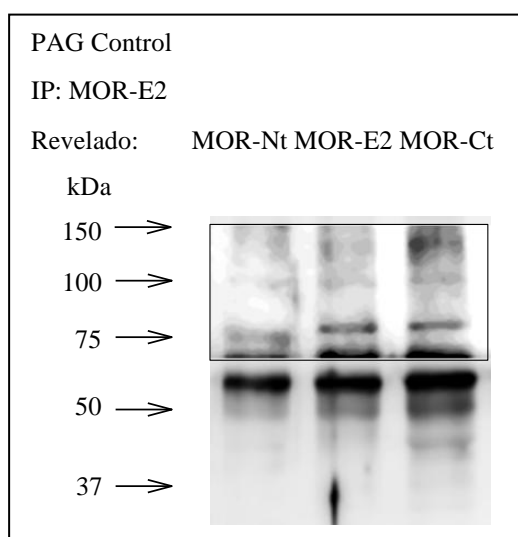


Figura 12. Inmunoprecipitación del MOR en PAG de ratón. Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en tampón Tris-HCl 50 mM/ NaCl 50 mM/ Nonidet NP-40 1 %, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al segundo bucle extracelular del MOR (MOR-E2). Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron por SDS-PAGE. Los receptores presentes se detectaron con anticuerpos dirigidos frente al extremo amino terminal (MOR-Nt), al (segundo bucle extracelular MOR-E2) y al extremo carboxilo terminal (MOR-Ct)

1.2.1.1. Efecto de una dosis única de opioides en el MOR.

A. Fosforilación e internalización del MOR inducidas por morfina.

Mediante inmunoprecipitación se analizó la presencia y la fosforilación del MOR tanto en la fracción de membrana (P2) como en la citosólica (S3). Los animales recibieron una dosis de 10 nmol/ratón de morfina y fueron sacrificados a distintos intervalos después de la administración del opioide, se procesaron los PAG y se realizaron los ensayos de inmunoprecipitación en condiciones desnaturizantes (Materiales y Métodos 2.6.2).

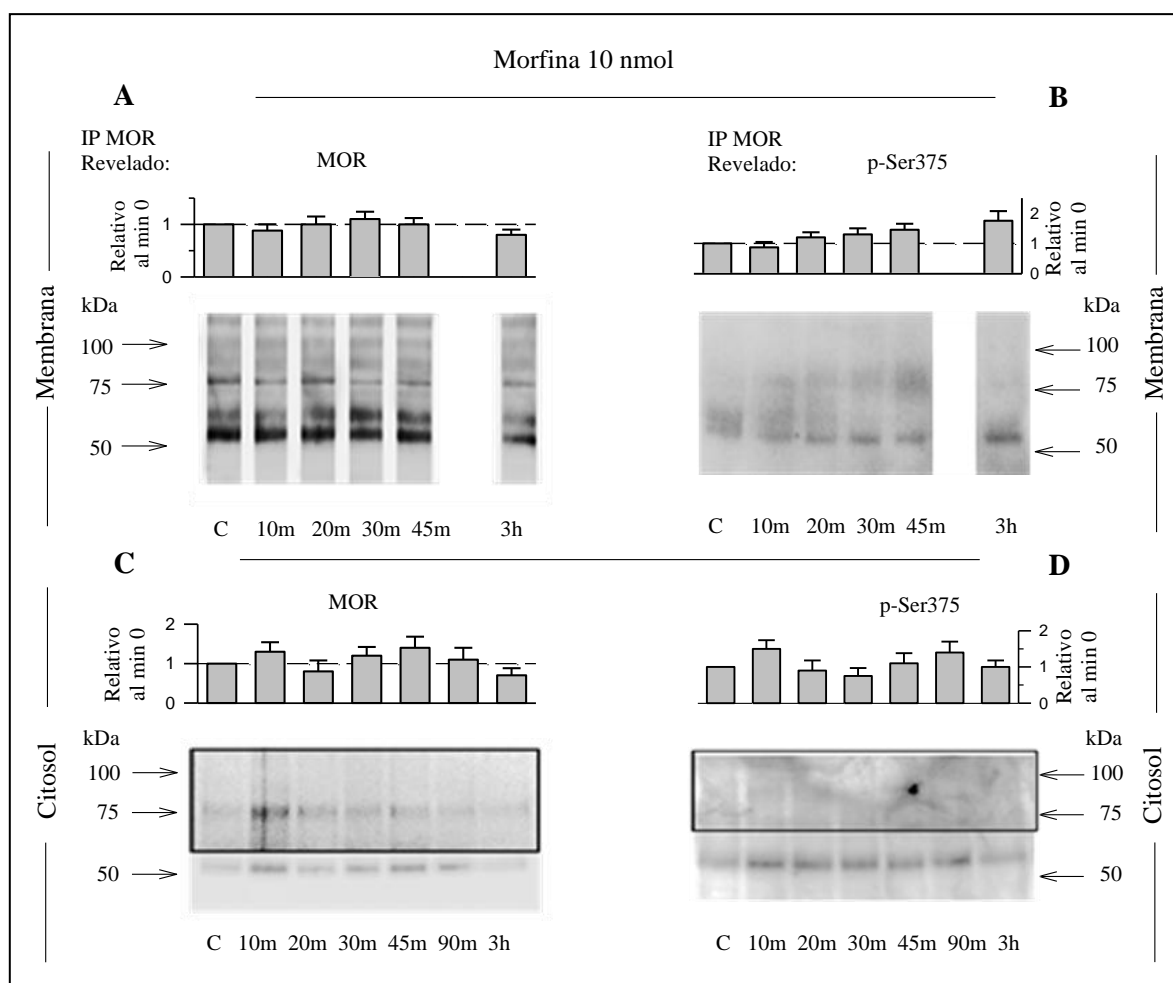


Figura 13. Influencia de la morfina en la presencia y en la fosforilación en Ser375 del MOR en superficie y citosol de PAG de ratón. Los ratones recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 10, 20, 30, 45, 90 minutos y 3 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales P2 (**A** y **B**) o fracción citosólica S3 (**C** y **D**) de PAG se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturizantes. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. Los receptores presentes se detectaron con anticuerpos dirigidos al extremo carboxilo terminal (MOR-Ct) (**A** y **C**) y a la forma fosforilada de la serina 375 del receptor MOR (p-Ser375) (**B** y **D**).

Los receptores se detectaron con el anticuerpo dirigido frente a una secuencia del extremo carboxilo terminal del MOR (MOR-Ct) y el anticuerpo dirigido frente a la serina 375 fosforilada del receptor MOR (p-Ser375). La fosforilación de la Ser375 está relacionada con la internalización del receptor y está mediada por la quinasa GRK2 (*El Kouhen y col., 2001; Schulz y col., 2004*) (Figura 13). No se observaron variaciones significativas en los niveles del MOR en membrana ni un aumento en la fosforilación de la Ser375. El marcaje del MOR inmunoprecipitado en la fracción citosólica fue muy débil tanto con el anticuerpo que detecta su presencia como con el específico de la Ser375, lo que indicó que no se produjo una internalización significativa.

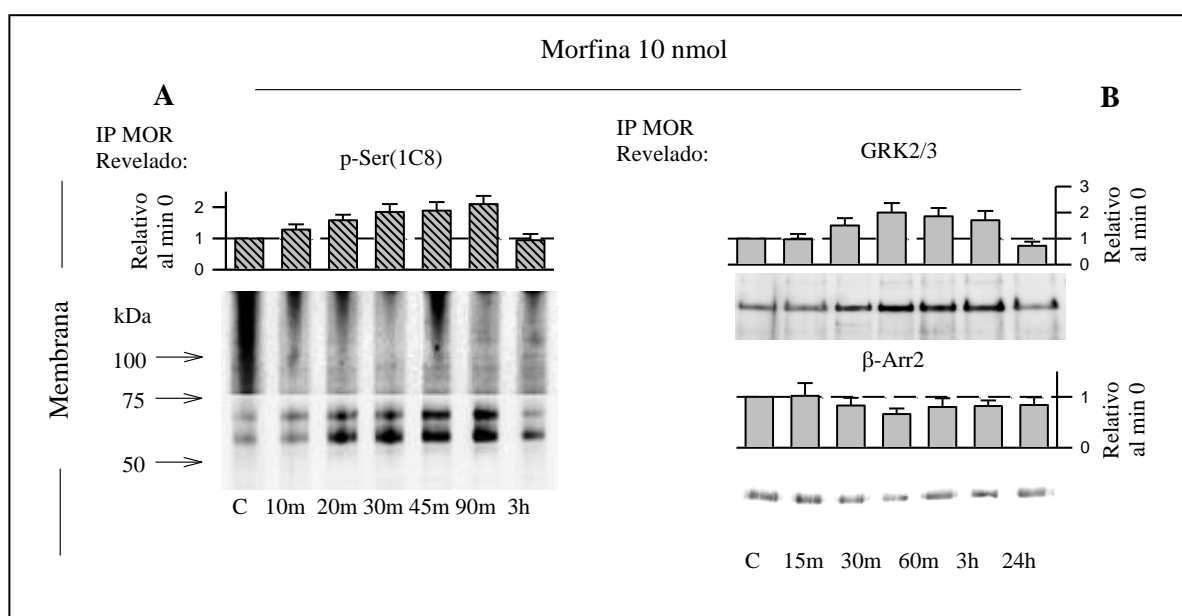


Figura 14. Fosforilación del MOR en serinas y co-precipitación con GRK2 y β-Arrestina 2 en PAG de ratón tras activación con una dosis de 10 nmol de morfina. Los ratones recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 10, 20, 30, 45, 90 minutos y 3 horas de la inyección. Membranas sinápticas omeales de PAG se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturizantes (A) o en tampón Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40 (B) y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Tras eliminar las IgGs, las proteínas precipitadas se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos de la quinasa GRK2/3 y la β-Arrestina 2 (β-ARR2).

Como respuesta a la activación por un agonista opioide, además de la fosforilación de la serina 375, otros residuos del receptor pueden ser fosforilados (*Ueda y col., 1995; Polakiewicz y col., 1998; Brüggemann y col., 2000; Schmidt y col., 2000; Cerver y col., 2001; McLaughlin y Chavkin, 2001*). Tras la administración de la morfina, cuando se utilizó el anticuerpo frente a serinas fosforiladas 1C8 (Figura 14.A) se detectó un aumento en la fosforilación del receptor. También se observó un incremento en la co-precipitación del MOR con la GRK2/3 debido a la morfina, la asociación de la β-arrestina con el MOR reveló una débil interacción que no se alteró tras la activación promovida por el opioide (Figura 14.B). Otras quinasas como la PKA, PKC o la CaMKII pueden ser también

responsables de la fosforilación en serinas (Ueda y col., 1995; Chakrabarti y col., 1998; Brüggemann y col., 2000; Bailey y col., 2004). Las GRK no sólo tienen como sustrato la Ser375 sino que otras serinas y treoninas de los receptores pueden ser sustrato de fosforilación de estas enzimas (Schmidt y col., 2000; Cerver y col., 2001). Estas modificaciones podrían provocar el desacoplamiento de los receptores de las vías de señalización, pero sin inducir su internalización (Schulz y col., 2004; El Kouhen y col., 2001; Chavkin y col., 2001; Cerver y col., 2004). Pasadas 3 horas tras la administración del opioide se recuperaron los niveles basales de fosforilación del receptor observados en situaciones sin estimular.

B. Fosforilación e internalización del MOR inducida por DAMGO

Se estudió el efecto de una dosis de 100 pmol/ratón de DAMGO:

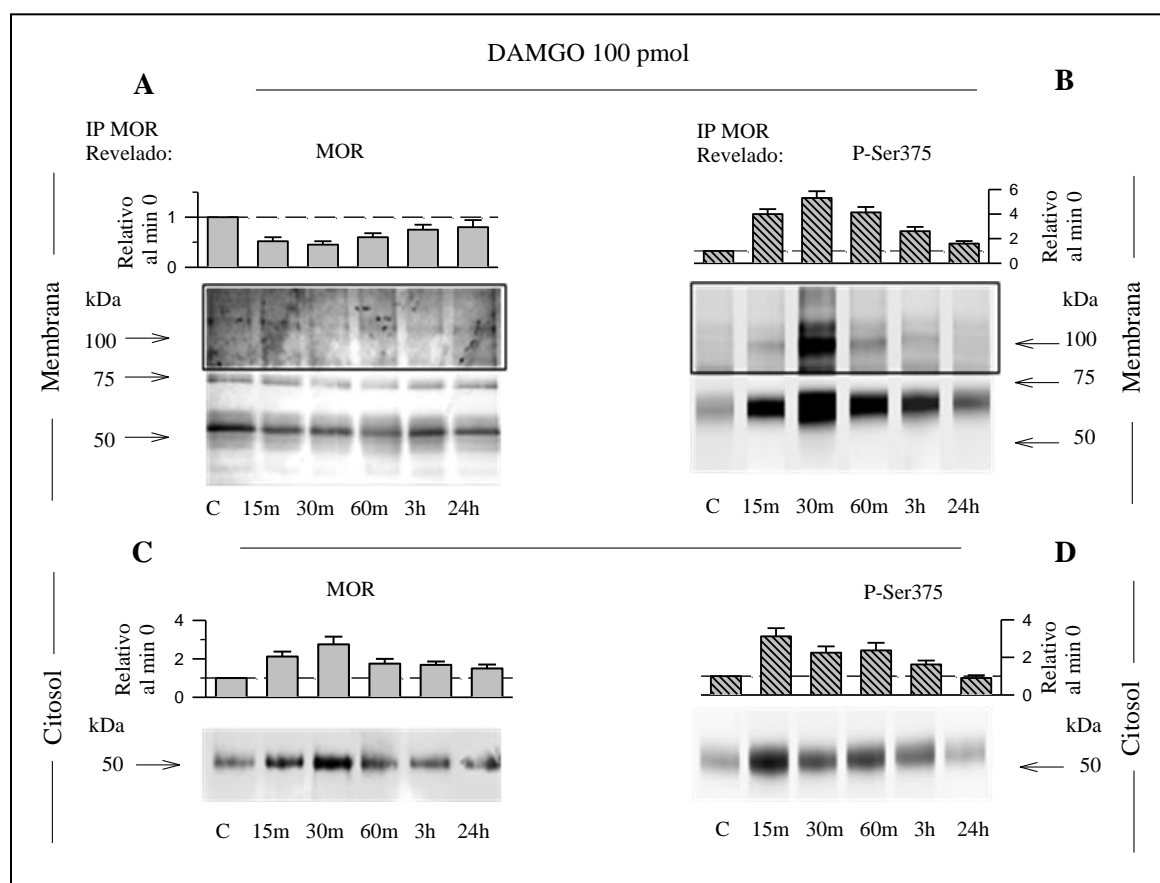


Figura 15. Influencia del DAMGO en la presencia y en la fosforilación en Ser375 del MOR en superficie y citosol de neuronas de PAG de ratón. Los ratones recibieron una dosis de 100 pmol de DAMGO y se sacrificaron a los 15, 30, 60 minutos, 3 y 24 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales P2 (A y B) o fracción citosólica S3 (C y D) de PAG se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturalizantes. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los sobrenadantes obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. Los receptores presentes se detectaron con anticuerpos dirigidos al MOR-Ct (A y C) y a la p-Ser375 (B y D).

A diferencia de lo que se ha visto con la morfina, en membranas sinaptosomales de PAG se observó que una dosis inicial de DAMGO 100 pmol produjo una fuerte fosforilación de la serina 375 del MOR así como su internalización (Figura 15). A las 3 horas de la administración del opioide se recuperaron los niveles en superficie del receptor. En la fracción citosólica, la presencia del receptor aumentó y se encontraba fosforilado en la serina 375.

El estudio de la precipitación del receptor con diferentes proteínas de la cascada de señalización mostró un aumento de su interacción con la GRK2/3 y con β -arrestina 2 (β -Arr2) 15 minutos después de la inyección del opioide (Figura 16.A). Los receptores MOR internalizados no estaban asociados a las subunidades $G\alpha i2$ o a los dímeros formados por $G\beta 1/2$, pero sí que co-precipitaron con β -Arr2 y C-Raf (Figura 16.B).

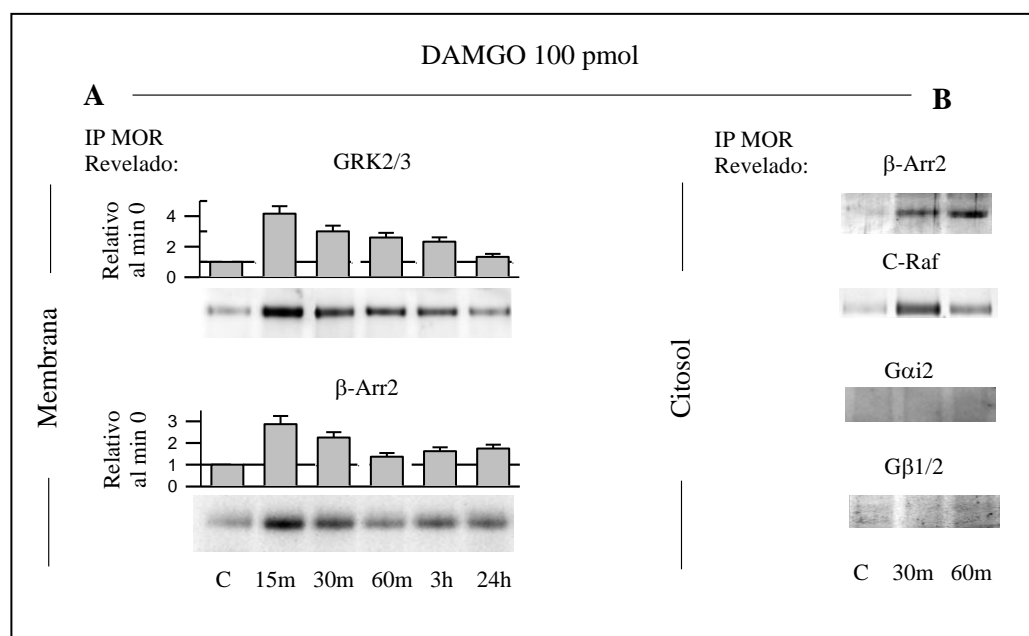


Figura 16. Co-precipitación con GRK2 y β -Arrestina 2 en PAG de ratón tras activación con DAMGO. Los ratones recibieron una dosis de 100 pmol de DAMGO y se sacrificaron a los 15, 30, 60 minutos, 3 y 6 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales (A) y fracción citosólica (B) de PAG se solubilizaron o en tampón Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos de la quinasa GRK2/3, β -arrestina 2 (β -Arr2), C-Raf, $G\alpha i2$, $G\beta 1/2$.

Estos resultados sugieren que el MOR inducido por la activación por DAMGO se desacopla de las proteínas G y se internaliza y que en esta internalización estarían implicadas las β -arrestinas.

1.2.1.2. Efecto de dosis repetidas de opioides en el MOR.

A. Dos dosis agudas.

Como se ha visto anteriormente dos dosis consecutivas de 10 nmol/ratón de morfina separadas al menos 6 horas entre sí, producen tolerancia a los efectos analgésicos del opioide (apartado 1.1, Figura 17). Siguiendo este protocolo de administración se estudió el estado del receptor MOR, su presencia y fosforilación en sinaptosomas y en la fracción citosólica de PAG de animales tratados.

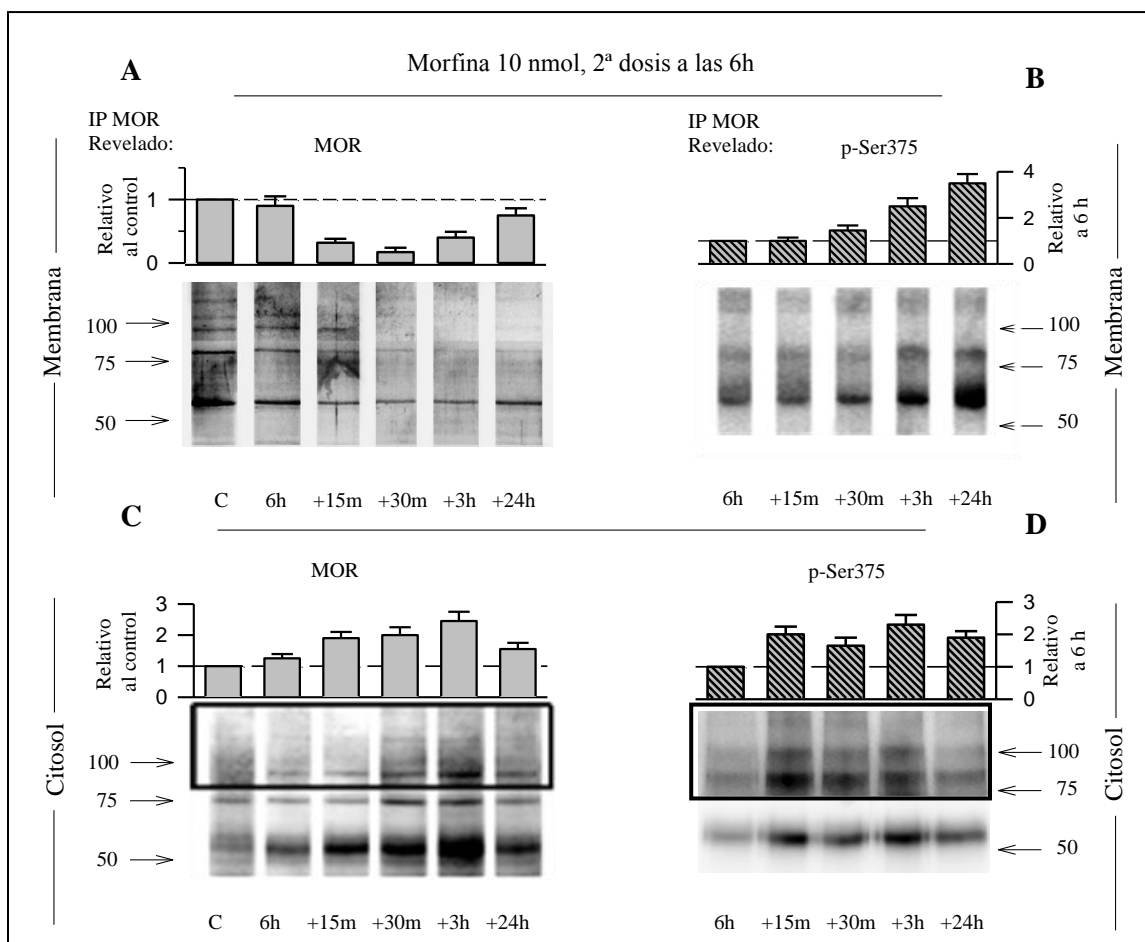


Figura 17. Influencia de dos dosis de morfina en la presencia y en la fosforilación en Ser375 del MOR en membrana y citosol de PAG de ratón. Los ratones recibieron una dosis de 10 nmol de morfina. Pasadas 6 horas se les volvió a administrar otra dosis de 10 nmol y se sacrificaron a los 15, 30 minutos, 3 y 24 horas de la segunda inyección. Membranas sinaptosomales P2 (A y B) o fracción citosólica S3 (C y D) de PAG se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturizantes. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Tras eliminar las IgGs, las proteínas precipitadas se separaron mediante SDS-PAGE. Los receptores se detectaron con anticuerpos dirigidos al MOR-Ct (A y C) y a la p-Ser375 (B y D).

La tolerancia apareció acompañada de una reducción de la presencia del MOR en la membrana y un aumento en los niveles de los receptores intracelulares (Figura 17.A y 17.C). Además, se observó

una notable fosforilación de los receptores en la Ser375 tanto en los presentes en membrana como en los internalizados (Figura 17.B y 17.D). Los MOR fosforilados en la serina 375 se pudieron detectar incluso 24 horas después de la segunda dosis.

La administración de dos dosis de morfina promovió tanto la internalización como la fosforilación del receptor. El descenso de los niveles del receptor en membrana se correlaciona con el aumento de los MOR internalizados. El reciclaje parcial de receptores opioides junto con la reducción de los intervalos entre dosis consecutivas, cada 6 horas, contribuiría al aumento la desensibilización antinociceptiva.

B. Repetidas dosis agudas.

Las diferencias observadas en la capacidad de los opioides para producir desensibilización se ha atribuido a su eficacia intrínseca: DAMGO activaría sólo una fracción de los MOR requeridos por morfina para producir efectos analgésicos comparables, promoviendo de esta forma mucha menos tolerancia.

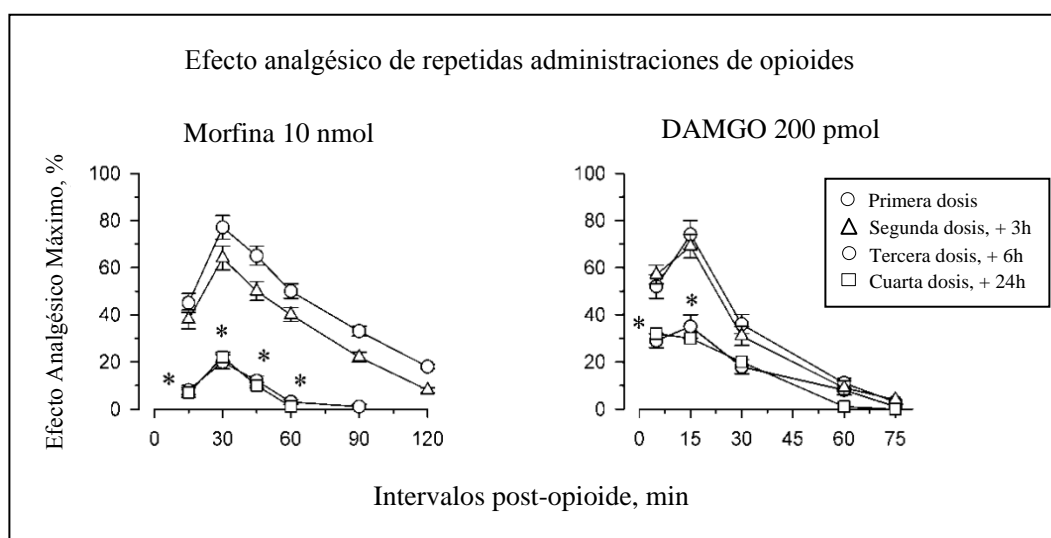


Figura 18. Analgesia inducida por los agonistas opioides Morfina y DAMGO. Curvas dosis-efecto obtenidas tras la administración inicial de 10 nmol de Morfina y 200 pmol de DAMGO y una segunda dosis de opioides similar a las 3, 6 y 24 horas después de que ratones recibieran la primera dosis. Se inyectaron los agonistas vía icv a los ratones y se determinó la analgesia a varios intervalos empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como un % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Estadísticamente diferente del grupo control (primera dosis) ANOVA-Keuls-Student test, $P < 0,05$.

Se llevó a cabo un protocolo de varias dosis consecutivas de 10 nmol/ratón de morfina o 100 pmol/ratón de DAMGO de separadas por 3, 6 y 24 horas de la primera administración para determinar

la posible disminución de la analgesia así como la desaparición del receptor de la membrana plasmática.

Siguiendo este esquema se observó una disminución de los efectos analgésicos tanto para la morfina, una reducción del 80 % al 20 % del EAM, como para el DAMGO, una reducción del 75 % al 35 % del EAM (Figura 18). Hemos visto que para la morfina con la segunda dosis ya hay pérdida de receptor en la membrana (Figura 17). El análisis del estado del receptor para el caso del DAMGO reveló que la segunda y la tercera dosis aumentaron la pérdida de receptores de superficie, incrementando los niveles de los internalizados (Figura 19.A y 19.C). La fosforilación de la serina 375 es muy marcada tanto en los MOR que aún quedan en la membrana como los que aparecen en la fracción citosólica (Figura 19.B y 19.D).

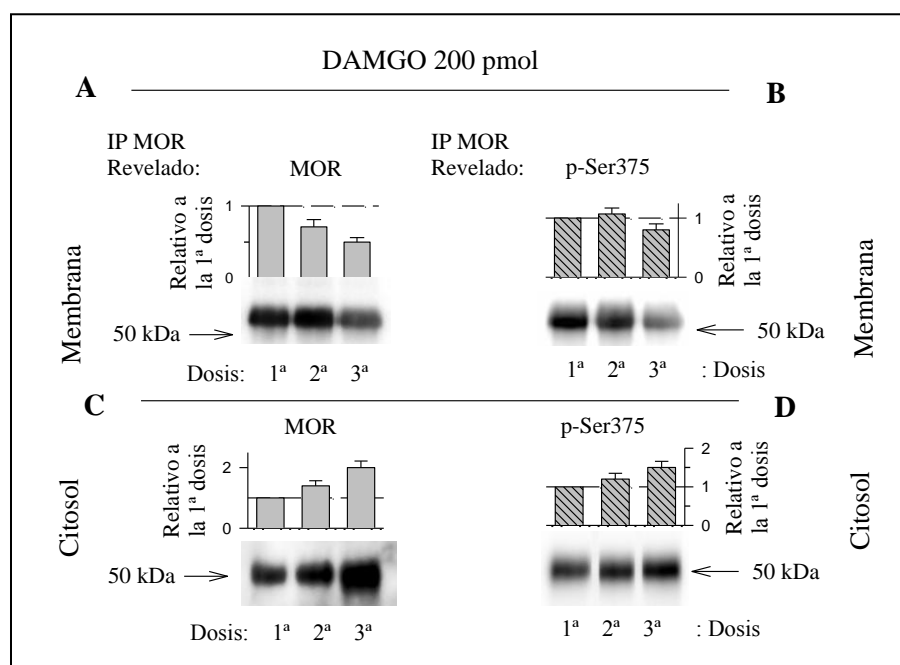


Figura 19. Influencia de varias dosis de DAMGO en la presencia y la fosforilación en Ser375 del MOR en superficie y citosol de neuronas de PAG de ratón. Los ratones recibieron una dosis de 200 pmol de DAMGO. Pasadas 3 y 6 horas se les volvió a administrar otra dosis igual a la inicial y se sacrificaron a las 3 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales P2 (A y B) o fracción citosólica S3 (C y D) de PAG se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturalizantes. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. Los receptores se detectaron con anticuerpos dirigidos al MOR-Ct (A y C) y a la p-Ser375 (B y D).

Las administraciones repetidas de DAMGO provocaron una pérdida paulatina del receptor en la superficie que no llega a recuperarse, el reciclaje no era efectivo, lo que favorece el desarrollo de la tolerancia a los efectos analgésicos del opioide puesto que no hay receptores que transmitan la señalización. Parte de los receptores internalizados siguen una ruta de reciclamiento para volver a la

membrana, sin embargo otra parte sigue procesos de degradación endocítica (*Schulz y col., 2004; Tanowitz y von Zastrow, 2003*). Para analizar este aspecto realizamos el subfraccionamiento celular.

B.1. Subfraccionamiento celular tras el tratamiento con DAMGO

El aislamiento de los orgánulos que componen la fracción citosólica de las células aporta información sobre las moléculas que los constituyen y la posibilidad de hacer un seguimiento de las proteínas que son endocitadas. Una vez que el tejido se ha homogenizado hay que separar los componentes según su tamaño y su forma (densidad). La muestra se fracciona por sedimentación por gravedad en un gradiente de densidad (sacarosa del 10 al 40 %). Las fracciones del gradiente de sacarosa que contienen las vesículas purificadas se analizan mediante *Western Blot* (adaptado de *Doyle y col., 1986*).

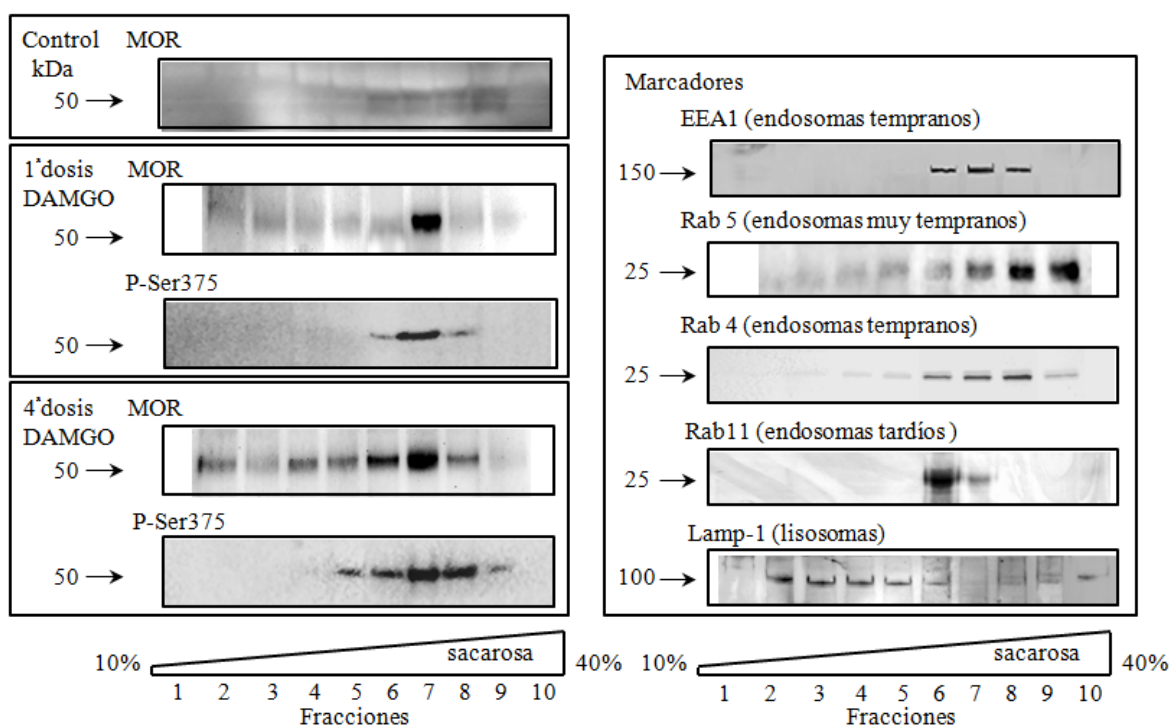


Figura 20. Subfraccionamiento celular de PAG de ratón tras varias dosis de DAMGO. Los ratones recibieron una dosis de 200 pmol de DAMGO. Pasadas 3, 6 y 24 horas se les volvió a administrar otra dosis de 200 pmol de DAMGO y se sacrificaron a los 30 minutos de la primera o de la cuarta inyección. La fracción citosólica (S3) se ultracentrifugó a 225.000xg durante 18 horas donde se separaron sus componentes en un gradiente continuo de 10-40 % de sacarosa. Las fracciones recogidas se concentraron y se separaron mediante SDS-PAGE. Los receptores presentes se detectaron con anticuerpos dirigidos al MOR-Ct y a la P-Ser375. Los anticuerpos correspondientes a los marcadores de orgánulos celulares son: EEA1 (endosomas tempranos), Rab 5 (endosomas muy tempranos), Rab 4 (endosomas tempranos), Rab 11 (endosomas tardíos), Lamp -1 (lisosomas).

El subfraccionamiento celular de la fracción citosólica de PAG (S3) de una muestra de ratones control no da un marcaje de receptor internalizado (Figura 20). A los 30 minutos de la inyección icv de 200 pmol de DAMGO se observó la internalización del MOR, detectado en las fracciones 6, 7 y 8 correspondientes a los endosomas tempranos y de reciclamiento, cuyos marcadores son el EEA1 (endosomas tempranos) y el Rab5 (endosomas muy tempranos). Después de cuatro inyecciones consecutivas de DAMGO según el protocolo descrito anteriormente, los receptores acumulados se pudieron detectar no sólo en las fracciones de los endosomas tempranos sino de la 2 a la 6 que correspondían a los endosomas tardíos y lisosomas, representados por los marcadores Rab11 y Lamp1 respectivamente. Estos últimos compartimentos son los encargados de la destrucción de las proteínas que se encuentran en su interior, lo que indica que tras varias administraciones de DAMGO los receptores acaban siendo degradados.

C. Administración crónica.

Los receptores MOR en la médula espinal tienen un importante papel en el desarrollo de tolerancia inducida por la administración continuada de opioides. Se analizó el MOR durante el desarrollo de tolerancia a morfina administrada subcutáneamente mediante la implantación de un pellet de 10 ml/kg de peso de una suspensión que contenía 0,1 g/ml de morfina base (adaptado por *Sánchez-Blázquez y col., 1997*). La morfina se libera de la suspensión alcanzando niveles de 10-13 nmol por ml en suero y sobre 10 nmol por gramo en cerebro entre 3 y 12 horas tras el implante.

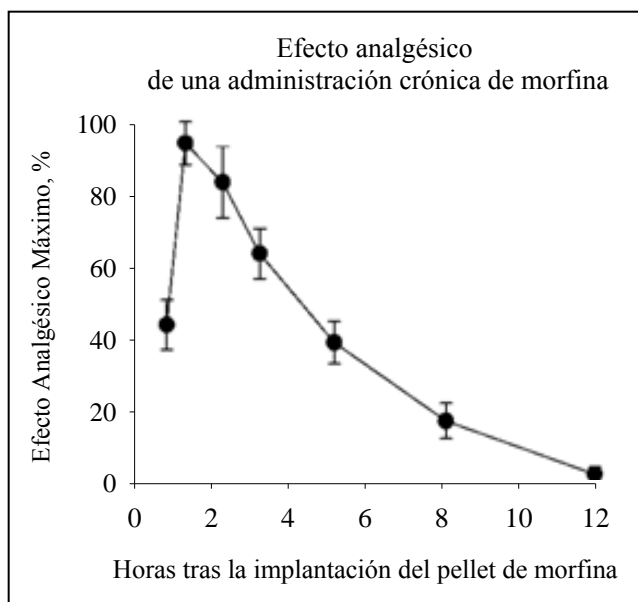


Figura 21. Analgesia inducida por el implante de un pellet de Morfina.

Curva dosis-efecto obtenida tras implantar en los animales un pellet subcutáneo de morfina. Se determinó la analgesia a varios intervalos empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como un % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

La tolerancia se detecta como la ausencia de respuesta analgésica a la morfina presente en el pellet desde las 24 horas post-implantación, a pesar de que la morfina en sangre no comienza a desaparecer hasta el cuarto día (*Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001*). En la hora siguiente a la

implantación de la morfina, se alcanzó el pico máximo de analgesia y sus efectos duraron hasta 12 horas después (Figura 21).

El análisis por inmunoprecipitación y posterior *western blot* del receptor MOR presente en médula espinal de animales tratados crónicamente con morfina reveló que la administración continua del opioide aumentó tanto la fosforilación en la Ser375 como la internalización del MOR (Figura 22). Estos cambios fueron rápidamente detectados, a las 3 horas de administración crónica ya se observó una reducción de los niveles del receptor en la membrana y un incremento de los residuos fosforilados. Estos efectos persistieron hasta 2 días post-implantación siendo en ese momento el nivel mínimo de receptor presente en superficie y el máximo de fosforilación.

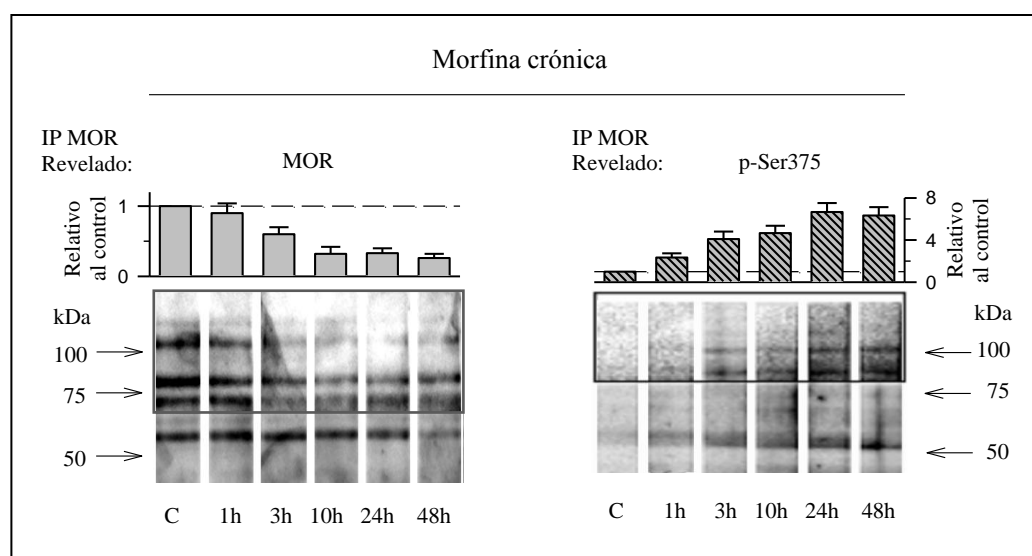


Figura 22. Efecto de la morfina crónica en el MOR de neuronas de la médula de ratón. A los ratones se les implantó un pellet de morfina y se sacrificaron a 1, 3, 10, 24 y 48 horas del implante. Membranas sinaptosomales P2 de médula se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturalizantes. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. Los receptores presentes se detectaron con anticuerpos dirigidos al MOR-Ct y a la p-Ser375.

En estudios previos del laboratorio (López-Fando y col., 2005) se evaluó la tolerancia crónica midiendo el grado de respuesta analgésica a una inyección del opioide vía icv a una dosis de 10 nmol/ratón en animales pretratados con un pellet de morfina. Se observó que entre el primer y el octavo día posteriores a la implantación del pellet, los animales presentaban una respuesta analgésica disminuida a la dosis aguda de morfina, recuperándose progresivamente a lo largo de esos ocho días. Al décimo día los animales presentaban una medida en el test del *tail flick* similares al grupo control, registrándose valores de analgesia sobre el 80 % de EAM que es lo esperado en función de la dosis que administramos.

La pérdida de receptores aumenta con el tiempo de exposición a morfina por lo que para volver a recuperar el control del sistema se deben sintetizar *de novo* y ser insertados en la membrana. Este periodo se correspondería con el tiempo que tardan los animales en volver a tener una respuesta analgésica similar a la inicial.

1.2.2. Desensibilización del MOR por transferencia de subunidades $G\alpha$

Tras una dosis inicial de un opioide los receptores MOR se activan, las proteínas $G\alpha$ cambian su configuración a su forma activa en GTP desacoplándose del receptor y separándose de los dímeros $G\beta\gamma$ pudiendo así regular a sus efectores diana. Estudios previos (Garzón y col., 2005; Rodríguez-Muñoz y col., 2007) han puesto de manifiesto que la tolerancia a una dosis de 10 nmol/ratón de morfina administrada icv es inducida por una transferencia estable de parte de las subunidades $G\alpha$ activadas por el MOR a las proteínas RGS de las familias R7 y RZ, aumentando los niveles libres del dímero $\beta\gamma$ e interfiriendo en la reconstitución del heterotrímero.

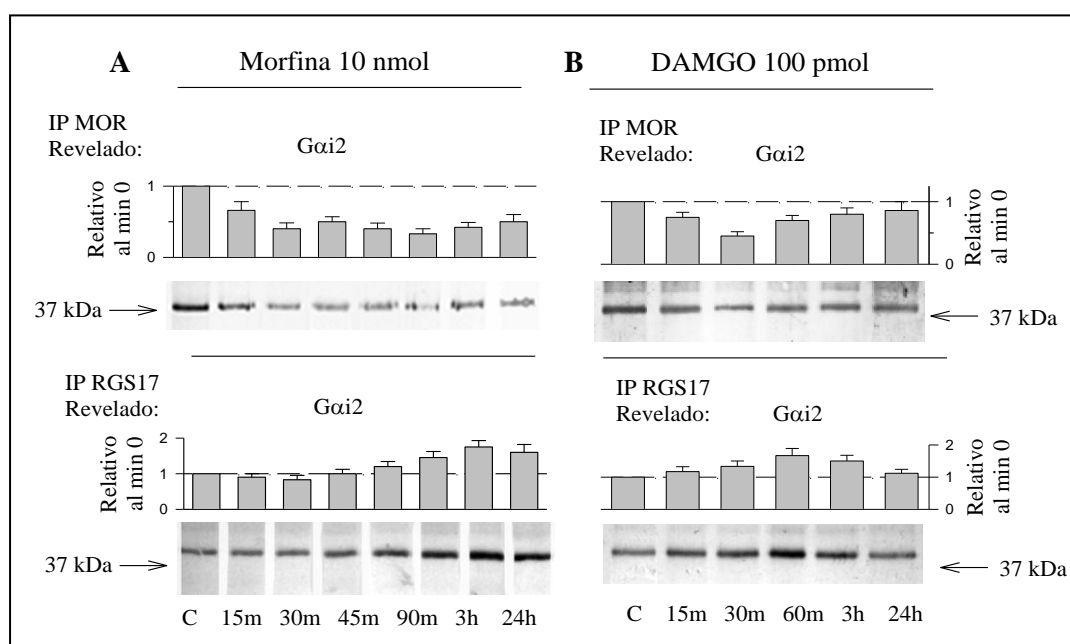


Figura 23. Transferencia de subunidades $G\alpha$ tras la activación de morfina o DAMGO. Los ratones recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección (A) o 100 pmol de DAMGO y se sacrificaron a los 15, 30, 60 minutos, 3 y 24 horas de la inyección (B). Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2 o de la RGSZ2. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con el anticuerpo de la subunidad $G\alpha i2$.

En este trabajo analizamos la transferencia de subunidades $G\alpha$ tras una dosis aguda de DAMGO desde el receptor opioide MOR hasta la RGS17 (Figura 23). Observamos que a diferencia de lo visto tras la inyección de 10 nmol/ratón de morfina, la administración de 100 pmol/ratón de DAMGO promovió una transferencia de subunidades $G\alpha_{i2}$ reversible (Figura 23.B). El receptor internalizado por DAMGO cuando volvió a la membrana se reasoció con las subunidades $G\alpha_{i2}$ quedando el sistema como antes de la estimulación por el agonista.

2. Estudio de los reguladores de proteínas G: RGS.

En los últimos años en el Laboratorio de Neurofarmacología de Instituto Ramón y Cajal se ha estudiado el papel que juegan las proteínas de la familia RGS, reguladores específicos de la señalización de las proteínas G, ya que están implicadas en la desensibilización del receptor opioide μ *in vivo*. Se ha analizado tanto implicación en la intensidad y la duración de los efectos de agonistas μ como su influencia en el desarrollo de la tolerancia en respuesta a dosis específicas de opioides. Las proteínas RGS potencian la actividad GTPasa acelerando la hidrólisis de $G\alpha$ GTP a $G\alpha$ GDP (GAP). En este sentido, se ha observado que la actividad GAP de las proteínas RGS-R4 y RGS-RZ reduce la amplitud de la analgesia opioide, y la desactivación eficiente de las subunidades $G\alpha_{z}$ GTP por las RGS-RZ previene la desensibilización del receptor MOR. Las proteínas RGS-R7 actúan como antagonistas de efectores al unir y secuestrar las subunidades $G\alpha_{i/o/z}$ activadas por el receptor μ , reduciendo así los efectos de los agonistas (Revisado en *Garzón y col., 2005*).

Uno de los objetivos de este estudio ha sido determinar el papel de la subfamilia R12, en particular RGS14, en los procesos de analgesia y el desarrollo de desensibilización y tolerancia en el sistema opioide.

2.1. Subfamilia RGS-R12.

Esta subfamilia, formada por la RGS10, RGS12 y RGS14 está presente en sistema nervioso. La RGS10 es una pequeña proteína de 173 aminoácidos, similar a las de la familia RGS-R4 que actúa como GAP para las subunidades $G\alpha_{i/o/z}$ (*Hunt y col., 1996; Popov y col., 1997; Chatterjee y Fisher, 2000; Waugh y col., 2005*). Las proteínas RGS12 y RGS14 comparten mayor similitud estructural, son más complejas puesto que además del dominio RGS que les confiere actividad GAP para las subunidades $G\alpha_{i/o}$, poseen un dominio GoLoco que funciona como inhibidor de la disociación de GTP (GDI) para las subunidades $G\alpha_{i1/\beta}$ y dos dominios de unión a Ras (RBD) que unen proteínas G monoméricas activas.

Analizamos la expresión génica de los miembros de esta familia en tejido neuronal mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (Figura 24). Se diseñaron unos cebadores específicos para

las tres RGS y se detectaron los números de copias de los ARN mensajeros (ARNm) de cada una de ellas mediante *SYBR Green*. Los niveles totales de ARNm en cerebro de ratón de la RGS12 y RGS14 eran similares aunque la expresión de la RGS14 era más restringida, localizándose principalmente en estriado y corteza cerebral.

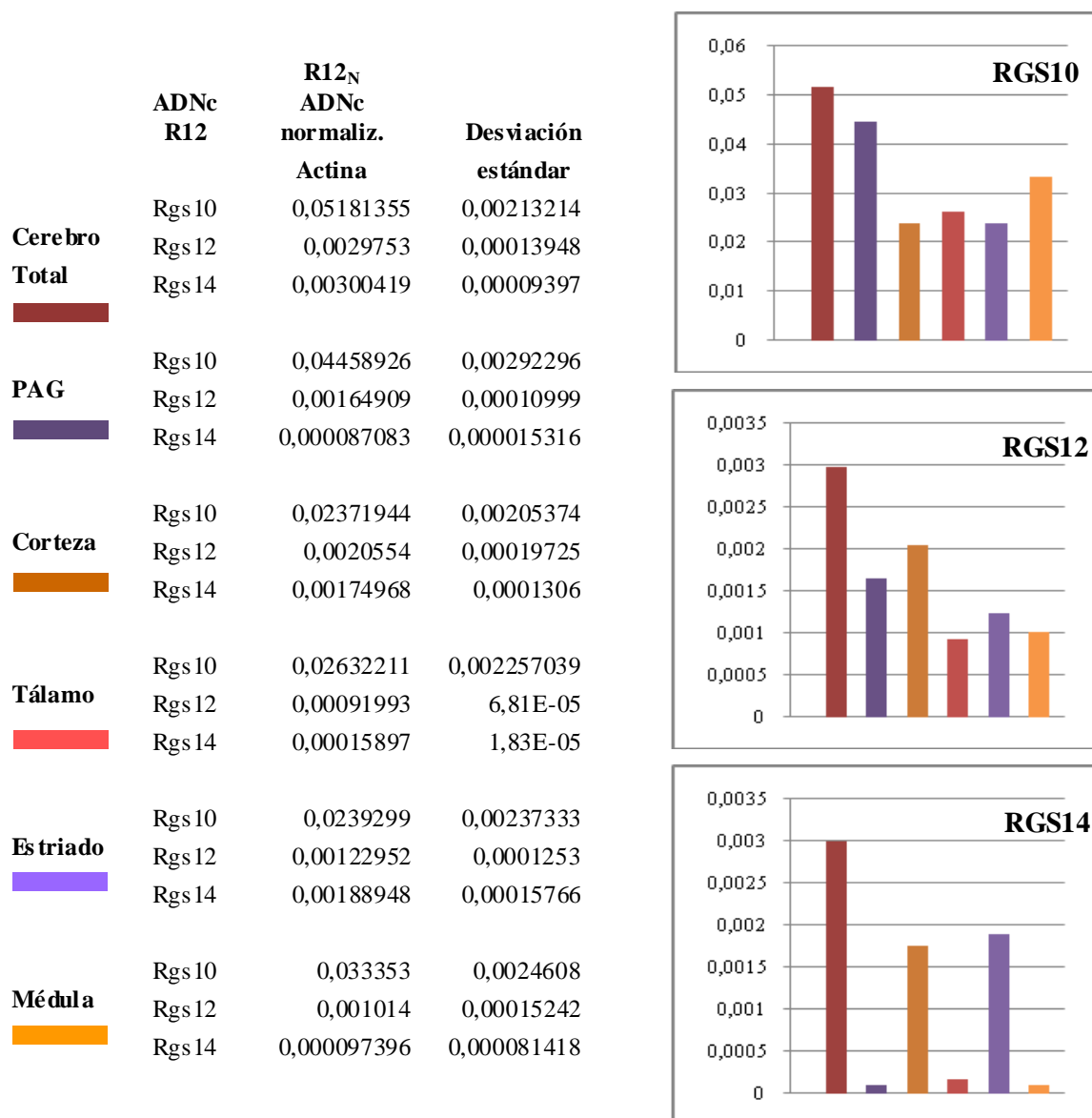


Figura 24. Determinación de los niveles de ARNm de la subfamilia R12 por PCR cuantitativa a tiempo real. El ARN mensajero se extrajo de las diferentes estructuras neuronales y se transformó a ADNcomplementario. Mediante *SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. Las muestras de ADN se realizaron por triplicado y en diluciones escaladas (1:5). Las placas con las muestras se introdujeron en el *ABI 7000 Sequence Detector*. El programa ABI 7000 calculó el valor Ct (*cycle threshold*, el ciclo umbral), que es inversamente proporcional al número de copias del gen de la muestra original. Se empleó la actina como estándar interno.

2.2. La proteína RGS14

Datos previos obtenidos en el laboratorio mostraron que la ausencia de cualquiera de los tres miembros de la subfamilia no modificó la aparición de tolerancia tras la administración de 10 nmol/ratón de morfina, la ausencia de la RGS14 dio lugar a un aumento de la potencia y la duración de los efectos de morfina. Esta proteína aparece asociada con el receptor MOR en ensayos de inmunoprecipitación (Garzón y col., 2005).

Snow y colaboradores detectaron a la RGS14 en membrana celular en una banda principal de 60 KDa que corresponde a su peso teórico y está enriquecida en cerebro y bazo (Snow y col., 1997). Para estudiar la presencia de esta RGS en SNC se desarrolló un anticuerpo dirigido frente a la secuencia aminoacídica 237-250. Se clonó la proteína RGS14 de ratón (Materiales y métodos 2.4.2) unida a GST y se comprobó la especificidad del anticuerpo generado estudiando el marcaje de la RGS14 con y sin GST (Figura 26.A).

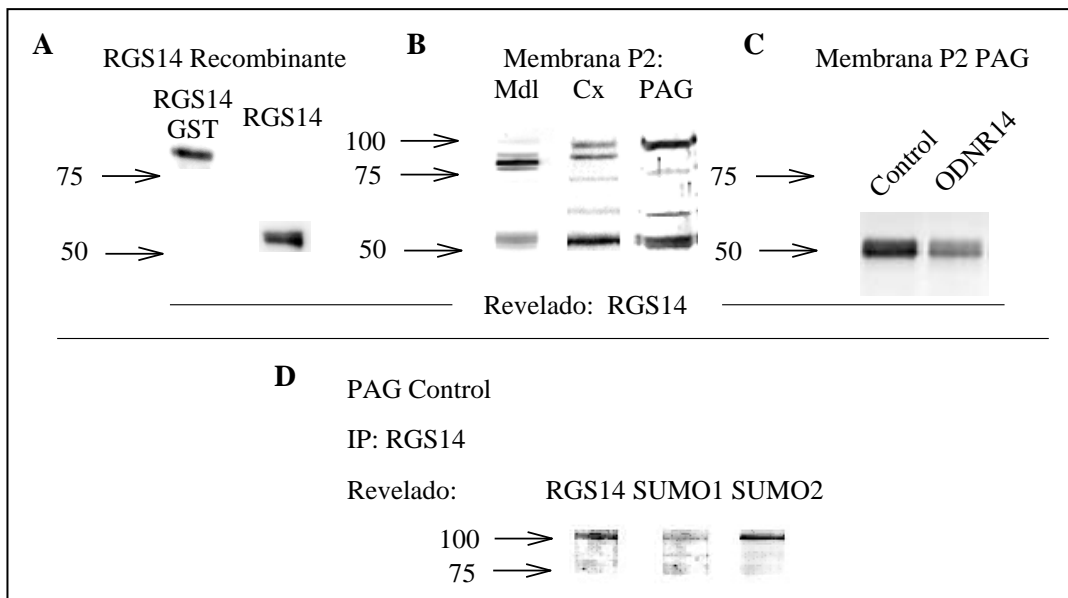


Figura 26. Presencia de la RGS14 en tejido neural. **A.** 1 µg de las proteínas recombinantes RGS14-GST y RGS14 (Materiales y Métodos 2.4.2) se separaron mediante SDS-PAGE. **B.** 60 µg de membranas sinaptosomales de médula espinal, corteza y PAG de ratón se separaron mediante SDS-PAGE. **C.** 60 µg de membranas sinaptosomales de PAG de ratón control y de animales que recibieron un tratamiento subcrónico de 5 días con el ODN de la RGS14 se separaron mediante SDS-PAGE. La RGS14 se detectó con el anticuerpo generado frente a la secuencia aminoacídica 237-250 de la proteína. **D.** Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturizantes y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a una región interna de la RGS14. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron en geles SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a la RGS14 y a los SUMOS 1 y 2.

La detección proteica revela su presencia en estructuras neurales como en médula espinal, corteza cerebral y PAG (Figura 26.B). Cuando se redujo la presencia de la RGS14 mediante un tratamiento subcrónico con el oligonucleótidos antisentido (ODN) frente a su ARNm, se observó un descenso en el marcaje de las bandas correspondientes a la proteína. En nuestro sistema se observó un doblete en 55 y 60 kDa y bandas superiores en 75 y 100 kDa, que podrían deberse a modificaciones post-traduccionales que alterasen su patrón de migración (*Cho y col., 2000; Hollinger y col., 2001*).

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que una modificación que afecta a ciertas RGS es la incorporación de SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) (*Rodríguez-Muñoz y col., 2007*) por lo que analizamos la posibilidad de que los pesos superiores observados para la RGS14 pudiesen deberse a la sumoilación de la proteína. Para ello, se inmunoprecipitó a la RGS14 en condiciones desnaturizantes y se incubó con anticuerpos que reconocen a la propia RGS14, al SUMO1 y al SUMO2 (Figura 26.D). Se observó que la banda detectada en 100 kDa es reconocida por los tres anticuerpos lo que indicó que la proteína contiene esta modificación. Para simplificar los resultados en los estudios posteriores consideraremos la banda de 55-60 kDa correspondiente a su peso teórico.

Una vez analizadas su presencia y sus modificaciones en el SNC estudiamos su relación con las proteínas G heterotriméricas y monoméricas mediante la técnica de inmunoprecipitación. La muestra de PAG control se solubilizó con el tampón Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40 1 % y se inmunoprecipitó con IgG biotinadas que reconocen a la RGS14. Los inmunocomplejos obtenidos se solubilizaron y se resolvieron mediante SDS-PAGE. Se incubó con anticuerpos frente a las subunidades α_0 , α_2 y α_z de las proteínas G heterotriméricas y con las proteínas G monoméricas Rap1, Rap2 y Ras (Figura 27), observándose co-precipitación con todas ellas. Estos resultados confirmaron que la RGS14 tiene la capacidad de actuar como una proteína integradora de la señalización mediada por las proteínas G heterotriméricas, en concreto asociándose con las subunidades $G_{\alpha i/o/z}$ y las proteínas G monoméricas, no sólo con los Rap sino también con el Ras.

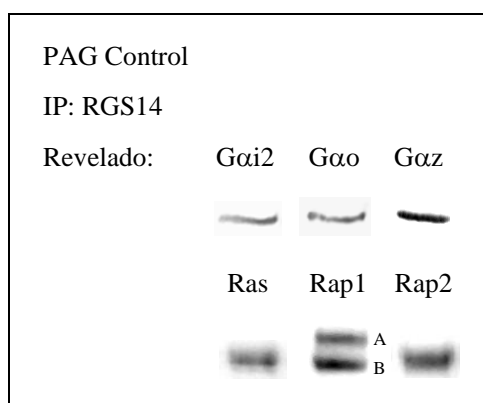


Figura 27. Co-precipitación de la RGS14 con las proteínas G en PAG de ratón. Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron con Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a una región interna de la RGS14. Los sobrenadantes obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos de las subunidades α_0 , α_2 , α_z , Rap1, Rap2 y Ras.

2.2.1. Asociación de la RGS14 con GPCRs.

Como se ha dicho anteriormente, la RGS14 es el único componente de la subfamilia RGS-R12 que co-precipita con el receptor MOR. Analizamos si la asociación de esta proteína se limita al receptor opioide MOR o aparece también con otros GPCR. Para ello, se solubilizó PAG control y se inmunoprecipitó a la RGS14 para detectar con diferentes anticuerpos frente a GPCR que se han desarrollado en el laboratorio si se asocian con ella. El marcaje de todos los GPCR analizados reveló co-precipitación de la RGS con el MOR, DOR, M2R (receptor muscarínico tipo 2), M4R (receptor muscarínico tipo 4), α 2AR (receptor α 2 Adrenérgico), CB1R, D2DR (receptor dopaminérgico tipo 2), 5HT1A (receptor serotoninérgico tipo 1A), 5HT2A (receptor serotoninérgico tipo 2A) (Figura 27.A).

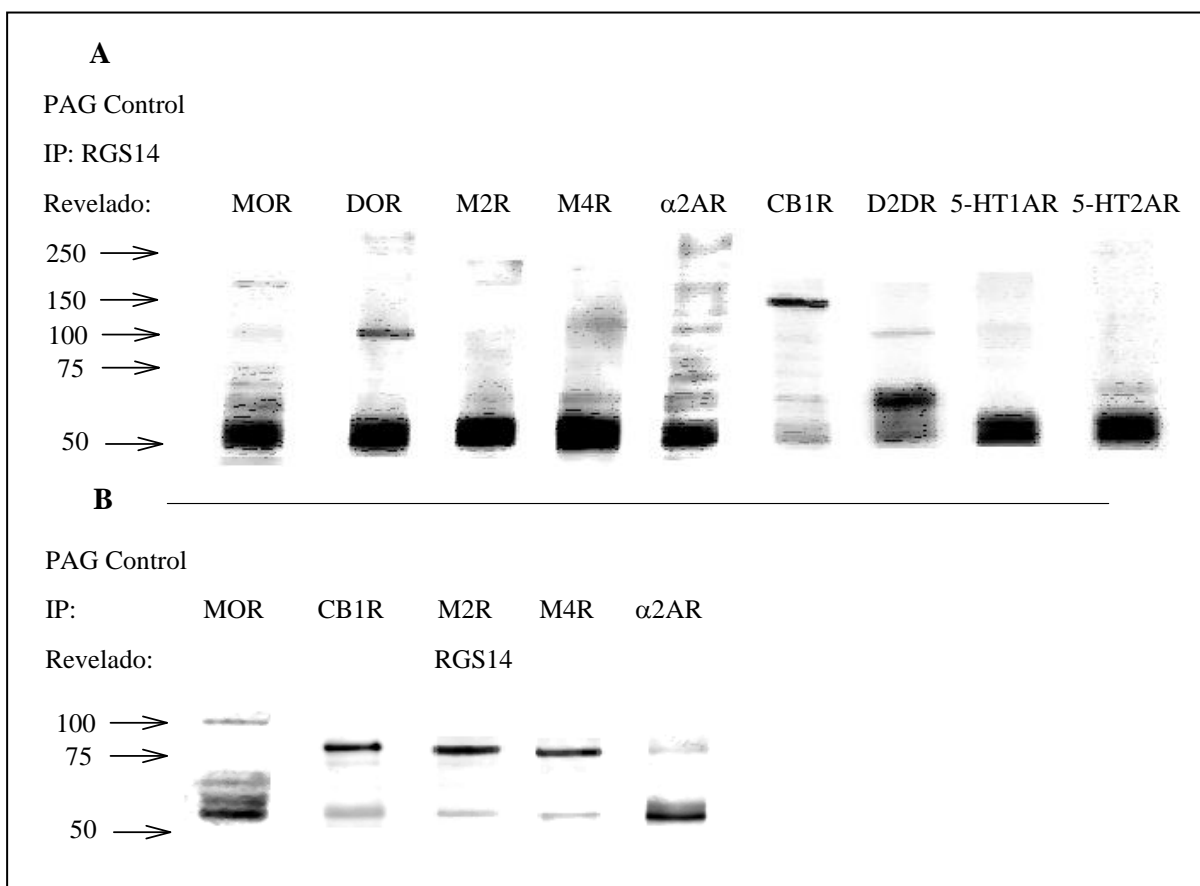


Figura 27. Co-precipitación de la RGS14 con receptores GPCR en corteza cerebral de ratón.

Membranas sinaptosomales de corteza cerebral se solubilizaron con Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a una región interna de la RGS14 (A) o frente a secuencias de los GPCR (B). Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos de los GPCR. GPCRs: MOR (receptor opioide Mu), DOR (receptor opioide Delta), CB1R (Receptor Cannabinoide tipo 1), M2R (receptor muscarínico tipo 2), M4R (receptor muscarínico tipo 4), α 2AR (receptor α 2 Adrenérgico), D2DR (receptor dopaminérgico tipo 2), 5HT1A (receptor serotoninérgico tipo 1A), 5HT2A (receptor serotoninérgico tipo 2A).

Los receptores mostraron un patrón en escalera característico de proteínas modificadas postraduccionalmente por ejemplo con glicosilaciones. Esta asociación también se detectó a la inversa, es decir, se precipitó a los receptores y se reveló con la RGS14 (Figura 27.B). Se utilizaron las IgG biotinadas dirigidas frente a MOR, CB1R, M2R, M4R y α 2AR en muestras de PAG control y se reveló con el anticuerpo de la RGS14. Las bandas detectadas de la RGS14 fueron principalmente las de 55-60 y 75 kDa. La banda de 100 kDa sólo se detectó asociada al MOR.

Para determinar si la asociación entre la RGS14 y los GPCR es directa se hicieron ensayos de interacción *in vitro*. Se utilizó la RGS14 recombinante, el dominio carboxilo terminal del receptor CB1R (Materiales y Métodos 2.4.2.) y el extremo carboxilo del receptor MOR clonado previamente en el Laboratorio. Se realizaron ensayos utilizando la proteína RGS14 acoplada a agarosa y los extremos Ct de los receptores en 200 μ l de Tris/NaCl. Se dejó 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, se sometió la mezcla a una centrifugación suave de 500xg y se hicieron 3 lavados de la agarosa para lavar el precipitado y evitar uniones inespecíficas. El pellet resultante se solubilizó en tampón de carga y se analizó por SDS-PAGE (Figura 28). Los extremos Ct de ambos receptores se asociaron a la proteína RGS14 recombinante acoplada a la agarosa. Estos resultados indicaron que la asociación entre esta RGS y el MOR y el CB1R se realiza de forma directa a través del extremo carboxilo terminal de ambos receptores.

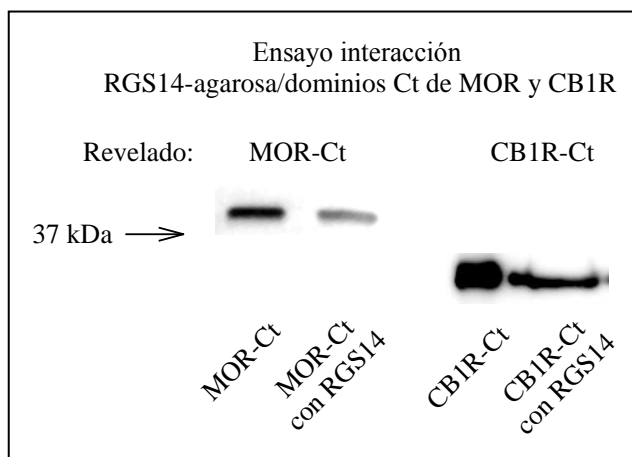


Figura 28. Asociación directa de la RGS14 con los Ct de los receptores MOR y CB1R. Se realizó un ensayo de interacción entre la proteína RGS14 recombinante acoplada a agarosa y las proteínas de fusión de los extremos Ct de los receptores con la GST, el MOR-Ct/GST (38 kDa) y el CB1R-Ct/GST (33 kDa). Lo asociado a la RGS14 se solubilizó y se analizó por *Western blot*. La primera calle de cada pareja corresponde a la cantidad de MOR-Ct/GST y el CB1R-Ct/GST utilizada en el ensayo, la segunda corresponde a lo asociado a la RGS14. La detección se realizó con anticuerpos específicos de los extremos carboxilo del MOR (MOR-Ct) y del CB1R (CB1R-Ct).

2.2.2. Asociación de la RGS14 con MOR tras su activación por agonistas.

Una vez caracterizada la asociación de MOR y RGS14 analizamos el efecto de la administración de agonistas opioides en dicha asociación. Los agonistas empleados fueron morfina y DAMGO.

Grupos de animales recibieron una dosis de 10 nmol/ratón de morfina o 100 pmol/ratón de DAMGO y fueron sacrificados a diferentes intervalos. Se extrajo el PAG y se solubilizaron las membranas sinaptosomales para realizar la inmunoprecipitación del receptor MOR. Se observó que la administración de morfina, que no produce internalización del MOR, no interrumpió la asociación del receptor con la RGS14. La administración de una dosis de DAMGO de 100pmol/ratón sí produce internalización del receptor (Figura 29). En este caso la presencia de la RGS14 fluctuó siguiendo el mismo patrón que el receptor, la presencia del MOR en la membrana disminuyó ya a los 15 min de la inyección del DAMGO y la RGS14 también redujo su asociación. A las 3 horas el receptor regresó a la membrana y volvió a aparecer asociado con la RGS14.

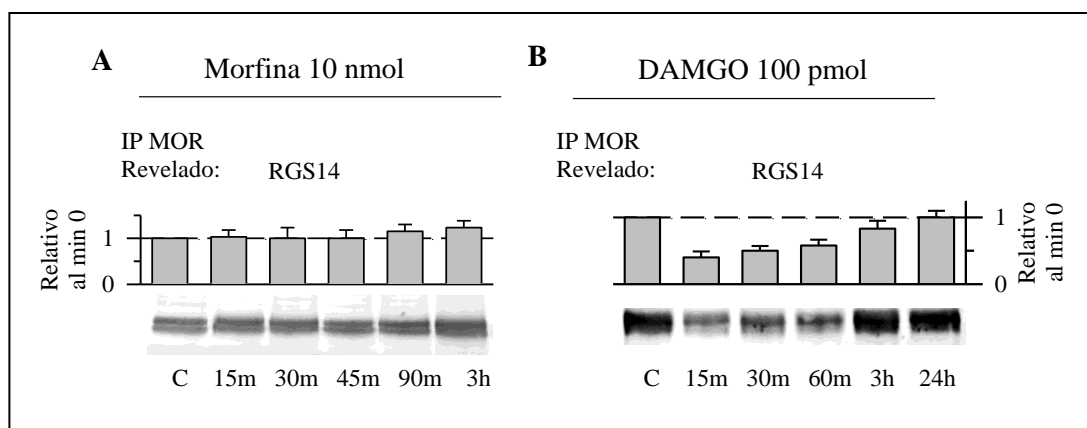


Figura 29. Asociación de la RGS14 con el MOR tras la activación de morfina o DAMGO. Los ratones recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos y 3 horas de la inyección (A) o 100 pmol de DAMGO y se sacrificaron a los 15, 30, 60 minutos, 3 y 24 horas de la inyección (B). Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-2E. Las proteínas inmunoprecipitadas, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpo específico de la RGS14.

2.2.3. Reducción de la expresión de la RGS14: *knockdown*

La RGS14 es una proteína que debido a su estructura, su localización y sus asociaciones posee un papel esencial en la regulación de la señalización acoplada a proteínas G. La pérdida de la expresión de *Rgs14*, *knockout*, en ratones es letal, los cigotos no progresan a la etapa de dos células (Martin-McCaffrey y col., 2004; Cho y col., 2005). Debido a que los animales *knockout* no son viables se buscó otra aproximación experimental para reducir los niveles de la proteína y ver así el efecto en el sistema opioide. Para los estudios realizados en nuestro Laboratorio con el objetivo de determinar la implicación de las RGS en la señalización opioide se redujo la expresión de las RGS mediante el uso de ODN frente al ARNm de la proteína de interés, *knockdown*. Los ODNs reducen específicamente los

niveles de las proteínas RGS sin alterar los niveles de otros miembros de la misma subfamilia, proteínas G o el de los receptores (Garzón y col., 2001, 2003, 2004, 2005a; Sánchez-Blázquez y col., 2003, 2005). Se utilizaron ODN frente al ARNm de la RGS14 para ver el efecto de la reducción de esta proteína en la señalización y regulación de los receptores opioides.

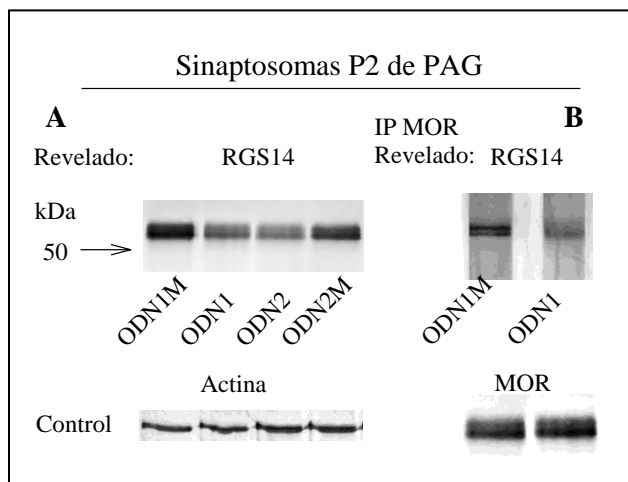


Figura 30. Efecto del ODNRGS14 en el PAG de ratón. **A.** Los animales recibieron el tratamiento subcrónico (durante 5 días) con el ODNM o con el ODN activo. Las membranas sinaptosomales de PAG, se separaron en geles SDS-PAGE. **B.** Se solubilizaron con Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron en geles SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos de la RGS14. La inmunoreactividad de la actina fue el control de carga de la membrana y la del MOR en el caso de la precipitación.

Los animales recibieron un tratamiento subcrónico con el ODN activo dirigido frente a la RGS14 (Materiales y métodos 2.3), los grupos de referencia recibieron las correspondientes inyecciones con el ODN control (ODNM, *mismatch*). Para ver la eficacia del tratamiento se analizó el perfil de bandas de la RGS14. ODNs dirigidos frente el ARNm de la RGS14 redujeron los niveles de las bandas detectadas con el anticuerpo específico de las RGS14 pero no produjeron cambios en otras como la actina (Figura 30.A). Por otra parte, también se comprobó si la asociación con el MOR disminuyó. Se precipitó al receptor MOR y su asociación con la RGS14 disminuyó en los animales tratados con el ODN de la RGS14 (Figura 30.B).

2.2.4. Influencia del *knockdown* de la RGS14 en la analgesia mediada por el MOR

En los estudios de comportamiento, cuando se estudió la analgesia producida por morfina o DAMGO en los animales *knockdown* para la RGS14, se pudieron apreciar las diferencias respecto a los animales control en diferentes protocolos de administración.

En los ratones donde la RGS14 aparecía reducida, la potencia analgésica de una única dosis de 10 nmol/ratón de morfina fue superior a la observada en los animales que recibieron el ODN control. Desde los primeros minutos el efecto de la morfina en analgesia fue significativo pasando del 20 % a más del 60 % del EAM. Esta dosis produjo menos desensibilización cuando se estudió el efecto de una dosis de morfina similar a las 24 horas de la primera, respecto a lo observado para animales control

(Figura 31.A). Una dosis de 100 pmol/ratón de DAMGO en los ratones *knockdown* tendía a disminuir el efecto analgésico comparado con ratones control pero sin llegar a ser significativo, y no se detectaron grandes diferencias en la actividad del opioide cuando se evaluó la analgesia 24 horas después (Figura 31.B). La RGS14 participa en la señalización mediada por ambos opioides pero su ausencia tiene un efecto potenciador para la morfina y sin relevancia para el DAMGO, reduciendo también la desensibilización del receptor MOR.

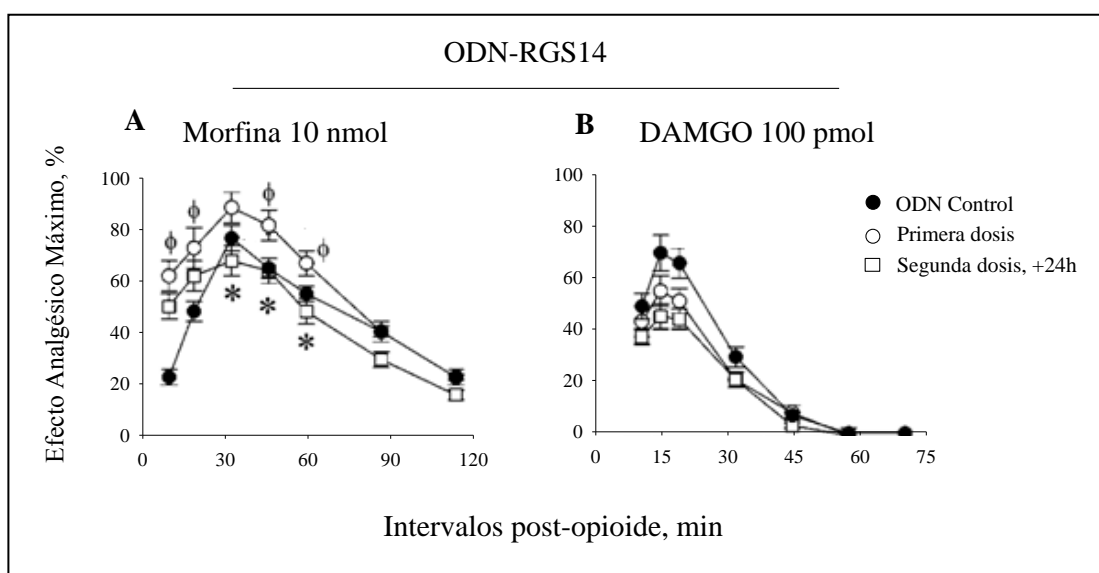


Figura 31. Influencia del ODN-RGS14 en la actividad antinociceptiva de la morfina y el DAMGO.

Curvas dosis-efecto obtenidas a partir de animales que recibieron un tratamiento subcrónico (durante 5 días) con el ODNM o con el ODN activo. Al sexto día se les administró 10 nmol/ratón de morfina (A) o 100 pmol/ratón de DAMGO (B). Pasadas 24 horas, se les administró una segunda dosis de esos opioides idéntica a la primera. Se inyectaron los agonistas vía icv a los ratones y se determinó la analgesia a varios intervalos empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como un % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. Φ Diferencia significativa entre el grupo inyectado con el ODNM1 (control) y el grupo ODN-RGS14. * Diferencia significativa entre el grupo ODN-RGS14 que recibe la segunda dosis de morfina y el grupo ODN-RGS14 de la primera dosis. Test de ANOVA-Student-Newman-Keuls; $P < 0.05$.

Para detectar la aparición de tolerancia se realizó el ensayo de administración de dosis repetidas de agonistas separadas en intervalos de 3 horas. En animales tratados con el ODN-RGS14 la segunda dosis de opioide mantuvo la eficiencia vista en la primera, es decir, la curva de la analgesia es más amplia para la morfina respecto a los animales control y más baja cuando se administra el DAMGO. Sin embargo, la tercera dosis administrada pasadas 6 horas de la inicial, ya produjo mucha menos respuesta analgésica, tanto para las dosis de 10 nmol/ratón de morfina como para la de 100 pmol/ratón de DAMGO (Figura 32).

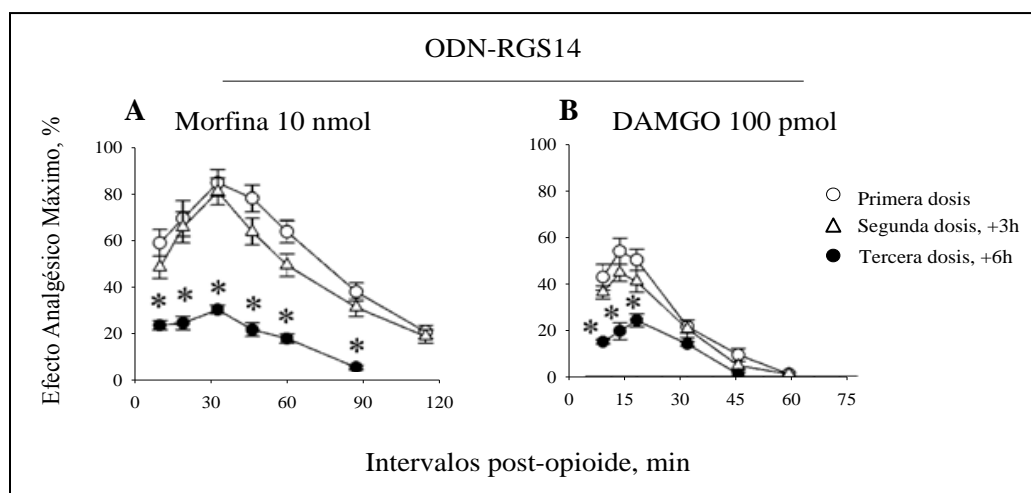


Figura 32. Influencia del ODN-RGS14 en la actividad antinociceptiva de la morfina y el DAMGO tras varias dosis de los opioides. Curvas dosis-efecto obtenidas a partir de animales que recibieron un tratamiento subcrónico (durante 5 días) con el ODNM o con el ODN activo. Al sexto día se les administró 10 nmol/ratón de morfina (A) o 100 pmol/ratón de DAMGO (B). Pasadas 3 y 6 horas, se les administró una segunda y tercera dosis, respectivamente, de esos opioides idéntica a la primera. Se inyectaron los agonistas vía icv a los ratones y se determinó la analgesia a varios intervalos empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como un % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Diferencia significativa entre el grupo ODN-RGS14 que recibe la tercera dosis de opioide y el grupo ODN-RGS14 de la primera dosis. Test de ANOVA-Student-Newman-Keuls; $P < 0.05$.

2.2.5. Influencia del *knockdown* de la RGS14 en el MOR durante su activación con morfina

Como se ha descrito anteriormente una única dosis de morfina es capaz de producir una profunda desensibilización de los MOR. El receptor aún permanece en la membrana plasmática pero no es fosforilado en la Ser375. Sí que se fosforila en otras serinas y aumenta su asociación con la GRK2/3 aunque no se promueve su internalización (Apartado 1.2.1).

Analizamos lo que ocurre en los animales donde la RGS14 aparece disminuida. Los animales fueron sacrificados a distintos intervalos después de la administración de 10 nmol de morfina. Se inmunoprecipitó al MOR en la fracción de membrana y en la citosólica de PAG de ratones a los que se les redujo los niveles de la RGS14 mediante un tratamiento subcrónico con el ODN-RGS14. En estos animales se observó una disminución de su presencia del MOR en superficie a partir de los 30 minutos, recuperándose a las 3 horas. Los niveles del MOR en el interior celular aumentaron a los 30 minutos de la inyección (Figura 33.A y 33.C). En estos animales *knockdown* para la RGS14, la morfina produjo un aumento en la fosforilación del residuo Ser375 del receptor MOR tanto en los receptores localizados en membrana (Figura 33.B) como en los internalizados de la fracción citosólica

(Figura 33.D). A las 24 horas de la administración de la morfina los niveles en membrana de la p-Ser375 de los receptores seguían elevados comparando con la situación basal.

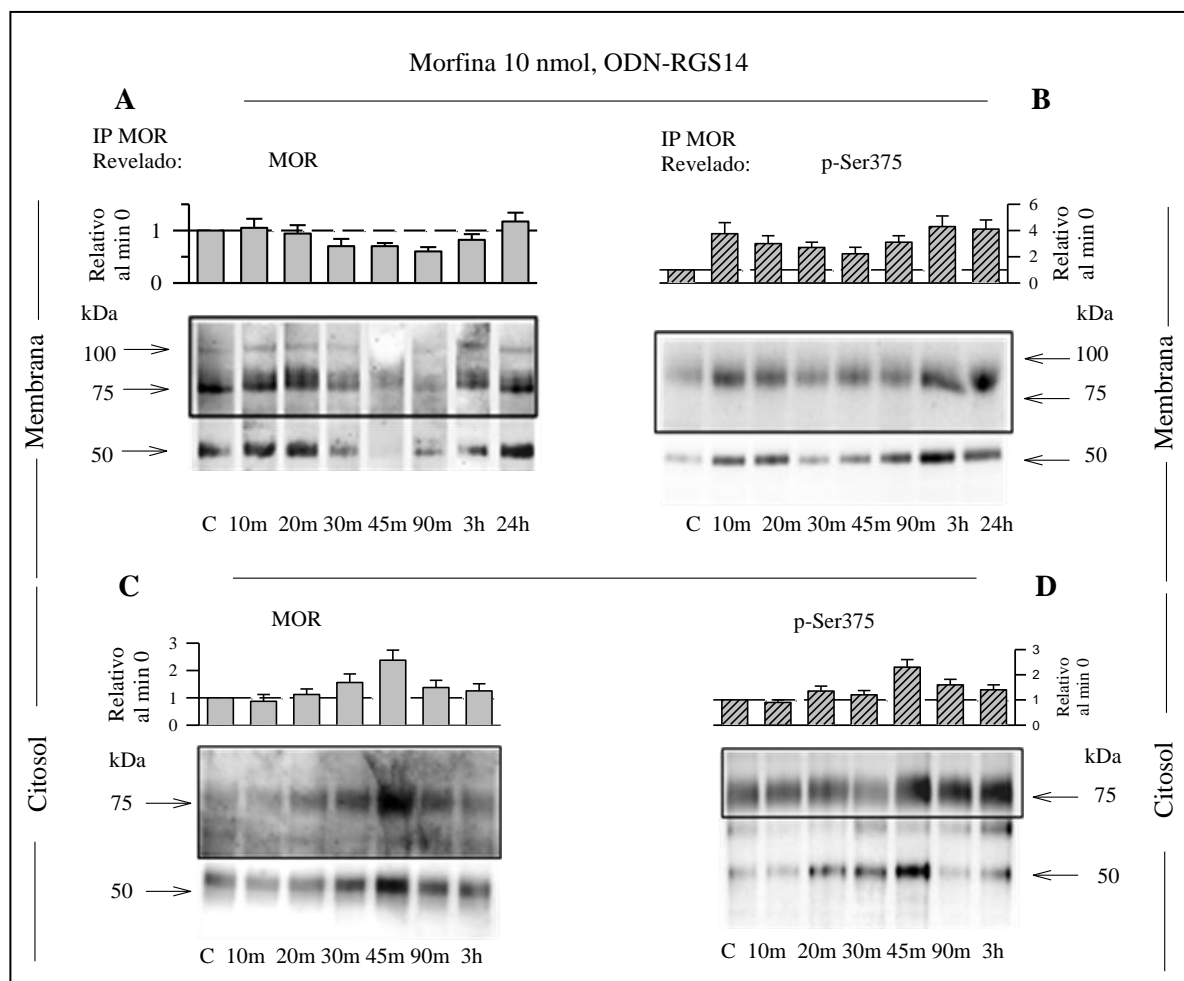


Figura 33. Influencia de morfina en la presencia y en la fosforilación en Ser375 del MOR en superficie y citosol de neuronas de PAG de ratones tratados con ODN-RGS14. Los animales recibieron el tratamiento subcrónico (durante 5 días) con el ODN-RGS14. Al sexto día los ratones recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 10, 20, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales P2 (A y B) o fracción citosólica S3 (C y D) de PAG se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturizantes. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. Los receptores se detectaron con anticuerpos dirigidos al extremo carboxilo terminal (MOR-Ct) (A y C) y a la forma p-Ser375 (B y D).

Se analizó la presencia de otras proteínas relacionadas con la maquinaria de internalización como la GRK2/3 y la β -arrestina2. Cuando se disminuyeron los niveles de la RGS14, al inmunoprecipitar a los receptores activados por morfina que quedaron en la membrana se detectó su asociación con la GRK2/3 y la β -arrestina 2. Las señales de estas proteínas co-precipitadas con los receptores MOR disminuyeron en los intervalos en los que el receptor se internalizó (Figura 34).

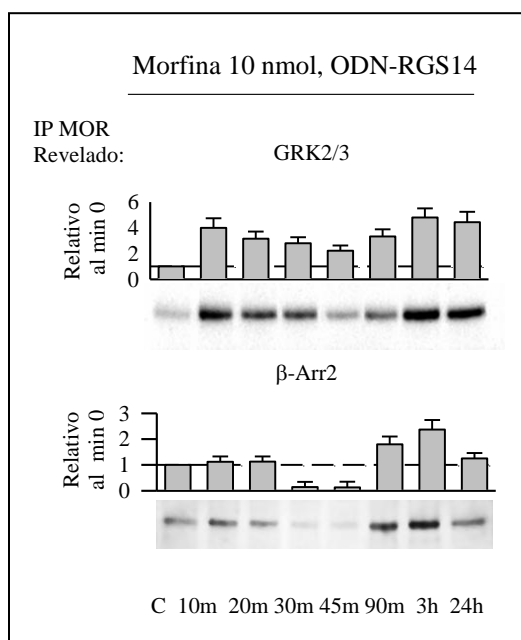


Figura 34. Co-precipitación del MOR con GRK2 y β -Arrestina 2 en PAG de ratón *knockdown* para la RGS14 tras activación con morfina. Los ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODN-RGS14. Al sexto día se les administró una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 10, 20, 30, 45, 90 minutos y 3 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a la quinasa GRK2/3 y la β -arrestina 2 (β -Arr2)

Estudios realizados por diferentes grupos en los últimos años han permitido establecer una correlación entre la fosforilación de los GPCR y su desensibilización. La fosforilación en la Ser375 se asocia con la internalización del receptor. La GRK2 es la proteína responsable de esa fosforilación, sin embargo otras quinasas pueden participar regulando su actividad e incluso fosforilando al propio receptor en otros residuos. Al reducir la RGS14 del sistema se detecta en el MOR una mayor fosforilación en la Ser375 cuando se activa con morfina, una asociación más clara con la β -Arrestina 2 y su internalización. Estos resultados sugieren que la RGS14 impediría el acceso a las quinasas o mediaría un proceso para evitar la fosforilación del receptor.

Además de los mecanismos clásicos dependientes de GRK- β -arrestinas, la activación de la PKC y de la ERK1/2 puede mediar o incrementar la desensibilización del MOR (*Schmidt y col., 2000; Bohn y col., 2002; Johnson y col., 2006; Dang y col., 2009*). Estas observaciones sugieren que la desensibilización del MOR puede deberse a diferentes mecanismos moleculares (*Bailey y col., 2006; Johnson y col., 2006*) o que esa desensibilización esté mediada por múltiples mecanismos.

3. Implicación de la vía de las MAPK en la señalización opioide

Muchos GPCR incluidos los receptores opioides tienen la capacidad de activar la cascada de las MAPK (*Fukuda y col., 1996; Li y Chang, 1996*). Una de las consecuencias de esa activación sería la participación de estas quinasas en la desensibilización del receptor MOR. Como se mencionó en la introducción podría deberse a la fosforilación directa del receptor por ERK, a la interacción directa/indirecta de la vía de las ERK con las GRK2 o a otras quinasas cuyo sustrato pueda ser el

propio receptor; o a un desacoplamiento de las subunidades $G\alpha$ donde las proteínas reguladoras de señalización de las proteínas G (RGS) estarían implicadas.

Agonistas opioides como la morfina promueven la actividad de la vía de las MAPK (*Schmidt y col., 2000; Belcheva y col., 2005*). Esta cascada se inicia con la activación de proteínas de la familia del Ras, que se une al RBD y al dominio rico en cisteínas (CRD) del Raf promoviendo la traslocación a la membrana donde el Raf se activa (*Marais y col., 1997; Okada y col., 1999*). Raf fosforila a las MEK activándolas y éstas a las MAPK (*Morrison y Cutler, 1997;*).

3.1. Efecto de la morfina en la traslocación de las proteínas de la cascada de las MAPK

Se analizó la influencia de una dosis de 10 nmol/ratón de morfina en la presencia en membrana y citosol de las proteínas G monoméricas y las MAPK durante el curso temporal del agonista. Las proteínas presentes en las membranas sinaptosomales y las fracciones citosólicas de PAG extraídos a diferentes intervalos de los ratones que recibieron la morfina se separaron mediante SDS-PAGE. Se emplearon los anticuerpos específicos frente a las proteínas G monoméricas Ras, Rap1 y Rap2, así como frente a las MAPK ERK1/2 y la p38, y la forma fosforilada de las ERK1/2 (p-ERK) (Figura 35).

La morfina promovió la traslocación del compartimento citosólico al compartimento de membrana de las proteínas G monoméricas así como de las MAPK estudiadas en el PAG. Desde el primer intervalo estudiado se detectó un incremento, los niveles máximos se correspondieron a los 45-90 minutos tras la inyección del opioide, llegando a ser hasta dos veces lo observado en situación control. Estos aumentos en la superficie celular, estaban acompañados por un descenso en la detección de estas proteínas en la fracción citosólica. En el caso de la detección de la forma activada p-ERK se observó un aumento en la fracción de membrana que se mantuvo hasta las 24 horas tras la inyección, y un leve incremento de esta forma fosforilada en la fracción citosólica a los 15 minutos después de la administración de morfina, reduciéndose luego los niveles en este compartimento.

3.2. Activación de las proteínas G monoméricas promovida por morfina

El estudio de las formas activas de las proteínas G monoméricas se realizó mediante la precipitación de estas proteínas con el dominio RBD de B-Raf y RaIGDS que se unen a Ras-GTP y Rap-GTP respectivamente (*Spaargaren y Bischoff, 1994; Herrmann y col., 1996; Franke y col., 1997*). Se clonaron estos dominios y se acoplaron a agarosa (Materiales y Métodos 2.4.1) para realizar ensayos de precipitación con ellos en las muestras problema.

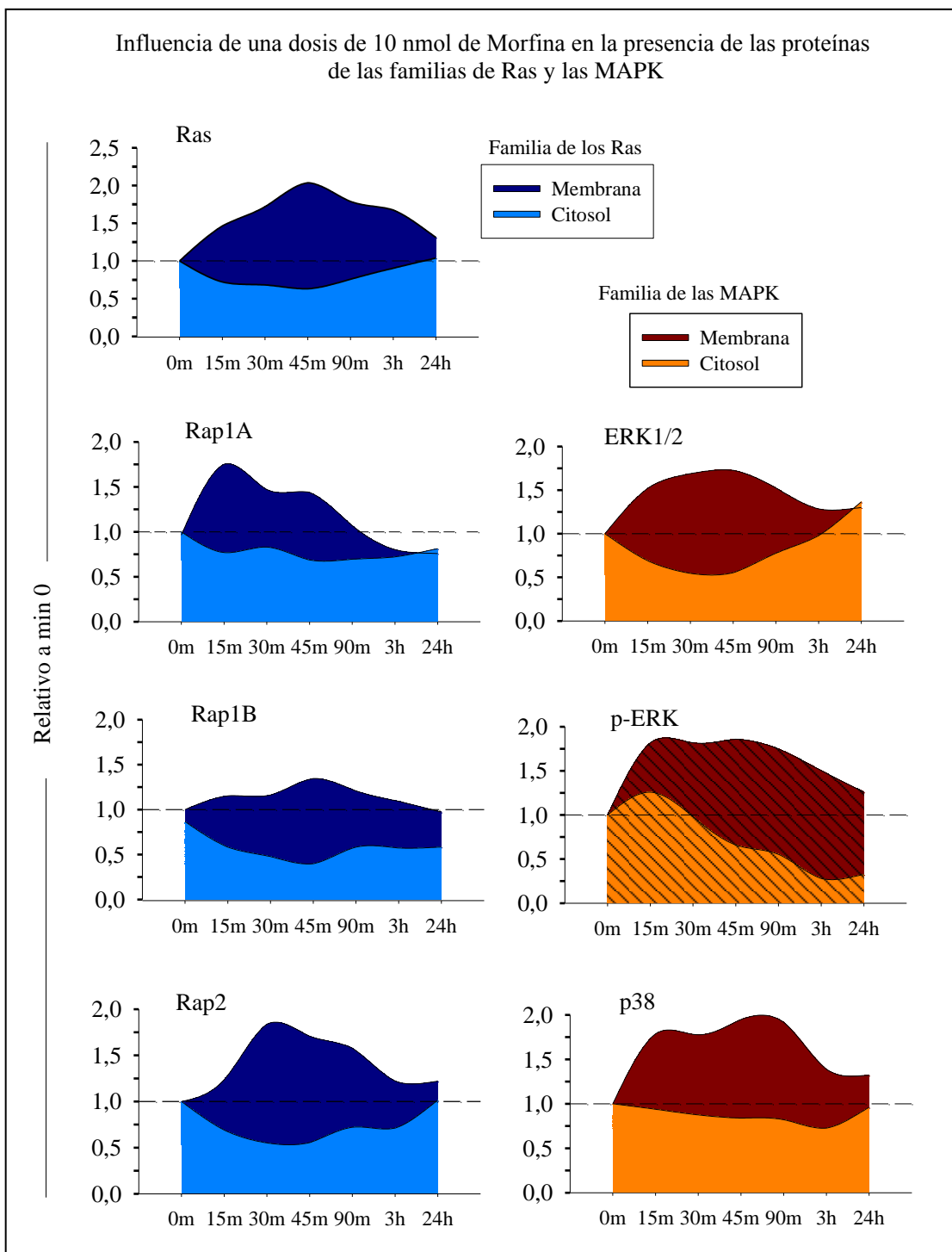


Figura 35. Variación de las proteínas G monoméricas y MAPK en membrana y citosol tras la activación con morfina en PAG. Los animales recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección. 40 μ g de las membranas sinaptosomales (azul oscuro y marrón) o de la fracción citosólica (azul claro y naranja) de los PAG se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos de Ras, Rap1 (que reconoce las isoformas A y B), Rap2, ERK1/2, p38 y la forma activada de ERK (p-ERK).

Tras la administración de una dosis aguda de 10 nmol/ratón de morfina, se extrajeron los PAG de los animales tratados. Se solubilizaron las membranas sinaptosomales de los PAG y se incubaron con los dominios RBD-agarosa del B-Raf para el Ras y del RalGDS para los Rap. Las proteínas precipitadas se separaron en geles SDS-PAGE y se realizó la detección con los anticuerpos específicos de las proteínas G monoméricas (Figura 36). Se observó un aumento de las formas activas de Ras, Rap1A, Rap1B y Rap2 en la superficie celular. El pico máximo de activación para Ras y Rap2 se encontró entre los 30 y 45 minutos tras la morfina volviendo a niveles similares al control tras 24 horas. El Rap1A también tuvo su máximo a los 30 minutos, sin embargo a las 24 horas la detección fue muy inferior al estado basal. El Rap1B mantuvo una activación elevada durante un intervalo de tiempo más amplio, aunque a las 24 horas recuperó también los niveles iniciales.

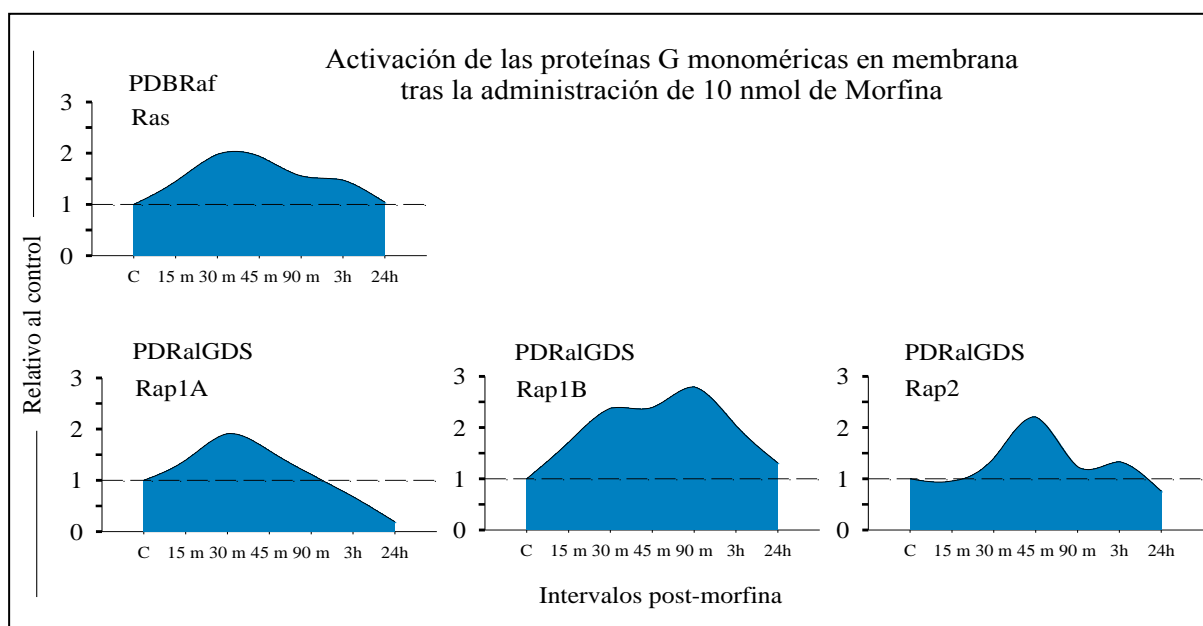


Figura 36. Activación de las proteínas G monoméricas tras la administración de morfina en PAG de ratón. Los animales recibieron una dosis de 10 nmol/ratón de morfina. Se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales P2 de PAG se solubilizaron con Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con el dominio RBD acoplado a agarosa del B-Raf para el Ras y del RalGDS para los Rap en estados de activación (Materiales y Métodos 2.4.1). Las proteínas precipitadas obtenidas, tras eliminar los RBD-agarosa, se separaron mediante SDS-PAGE. Se realizó la detección con anticuerpos dirigidos al Ras, Rap1 (que reconoce las isoformas 1A y 1B) y Rap2.

La administración de la morfina incrementó los niveles de la presencia de estas proteínas en la fracción de membranas, que se correspondieron con un aumento en su estado activado en GTP. En la membrana los Ras y Rap se unirían a proteínas que actuarían como factores de intercambio de GTP (GEF) promoviendo su activación, como Src (Ahn y col., 1999; Luttrell y col., 1999); también se ha observado una activación de Ras mediada por NO (Yun y col., 1998) o por el aumento del AMPc (York

y *col.*, 1998). Una vez activados los Ras y Rap se asociarían a otras proteínas que serían sus efectores como los Raf (*Marais y col.*, 1997; *Vossler y col.*, 1997; *York y col.*, 1998).

3.3. RGS14 como proteína *scaffold* para la cascada de las MAPK

Las proteínas *scaffold* (andamio) juegan un papel determinante en la regulación de la amplitud y la duración de la señalización. Las proteínas *scaffold* clásicas para las MAPK muestran una interacción con múltiples componentes de la ruta. Tienen dos funciones: mantener las proteínas de la vía próximas y aportar una localización celular específica. Al unir a las MAPKKK, MAPKK y MAPK en un complejo multienzimático, estas moléculas *scaffold* específicas de las MAPK proveen de un entorno físico aislado donde las señales pueden transmitirse en el lugar apropiado y en el momento adecuado.

La RGS14 facilita la formación del complejo multiproteico de Raf/MEK/ERK dependiente del Ras activado. La RGS14 es capaz de unirse a las proteínas G monoméricas en GTP y lo hace a través de del dominio RBD1 (*Traver y col.*, 2004; *Kiel y col.*, 2005; *Mittal y Linder*, 2006). La unión de Ras-GTP parece promover la unión del resto de proteínas de la cascada (*Willard y col.*, 2009). La RGS14 puede unir también directamente a los Raf (*Shu y col.*, 2010), quizás también a través de su RBD2 como lo hace la RGS12 (*Willard y col.*, 2007).

En PAG se ha visto que la RGS14 coprecipitó con las proteínas G monoméricas (Figura). Al aumentar los niveles de Ras, Rap1 y Rap2 no sólo en presencia sino en su forma activa tras la administración de morfina, se estudió su asociación con la RGS14. Se extrajeron los PAG de animales que recibieron una dosis de 10 nmol/ratón de morfina *icv* y se inmunoprecipitó la RGS14. Por *Western blot* se estudió la variación de la asociación de Ras, Rap1 y Rap2, así como de las ERK1/2 con la RGS14 (Figura 37).

Para todas las proteínas estudiadas se observó un aumento en la asociación con la RGS14 promovida por la activación del sistema con morfina. El Ras aumentó de forma progresiva manteniéndose en niveles elevados hasta las 3 horas tras la inyección, a las 24 horas se recuperaron niveles similares a los de la situación control. El Rap2 aumentó de forma progresiva hasta llegar a un máximo a las 3 horas de la administración del opioide, manteniéndose elevados a las 24 horas post-inyección. Rap1A y Rap1B mostraron un pico de asociación a los 45 minutos y a los 90 minutos los niveles estaban próximos a los obtenidos sin estimulación. Las ERK1/2 aparecían asociadas a la RGS14 desde los primeros minutos y se mantuvieron los niveles hasta las 24 horas.

Como se vio, la RGS14 tras la activación con morfina permanecía en el entorno del MOR (Figura 29). El aumento de estas proteínas de la cascada de las MAPK con la RGS por un lado serviría

para mantener a las proteínas próximas entre sí facilitando su interacción, y por otro, localizarlas en el entorno del receptor opioide donde pudiesen alcanzar a efectores y a la vez reteniéndolas en la superficie celular sin poder acceder a otros localizados en el citosol o el núcleo.

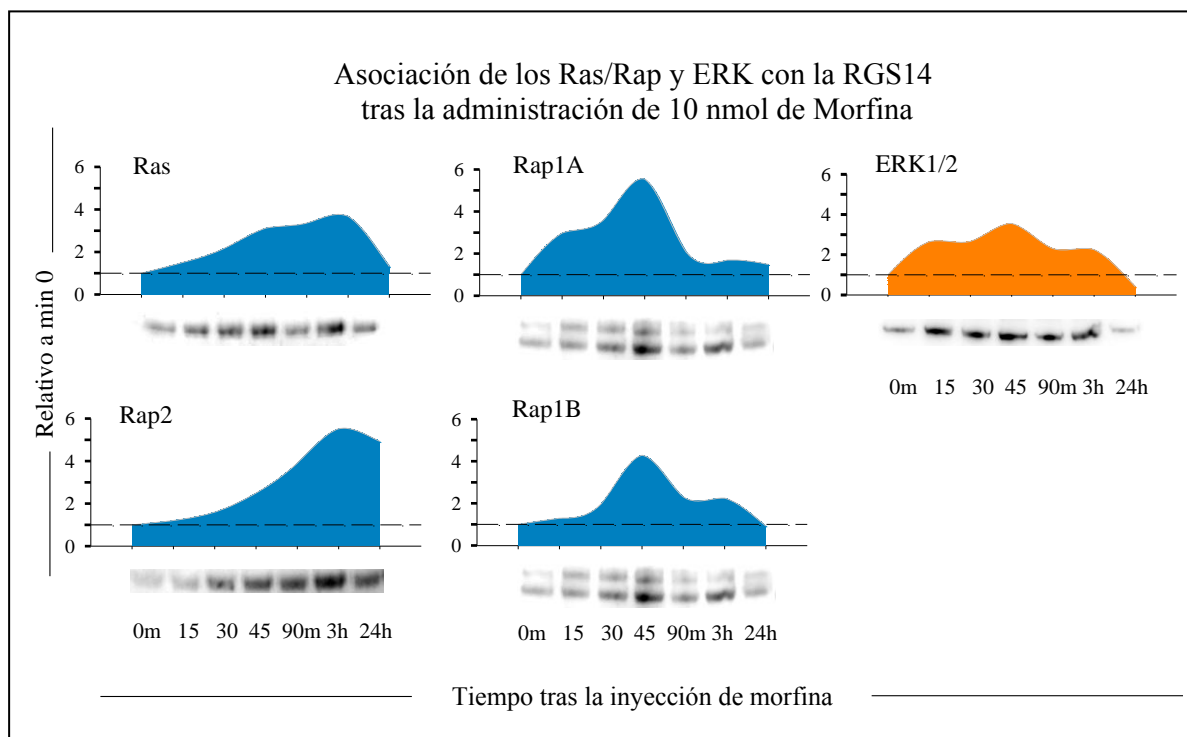


Figura 37. Asociación de las proteínas G monoméricas y MAPK con la RGS14 tras la administración de morfina en PAG de ratón. Los animales recibieron una dosis de 10 nmol/ratón de morfina. Se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a la RGS14. Los sobrenadantes obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. Se realizó la detección con anticuerpos dirigidos al Ras, Rap1, Rap2 y ERK1/2.

3.4. Efecto del ODNRGS14 en la activación de las proteínas de la cascada de MAPK promovida por morfina

Debido a la asociación observada entre la RGS14 y las proteínas de la familia de Ras durante el curso temporal de la analgesia promovida por morfina, se decidió estudiar el papel de RGS14 en el control de estas proteínas activadas por morfina. Se realizó un tratamiento subcrónico de 5 días con el ODNRGS14 para reducir los niveles de expresión de la proteína. Al sexto día a los animales se les administró una dosis de 10 nmol/ratón de morfina y se estudiaron los niveles de activación de Ras, Rap1 y Rap2 (Figura 38). En una primera fase del estudio se analizó el efecto de la reducción de la RGS14 en los niveles basales de la activación de estas proteínas. Cuando se precipitó con los RBD-agarosa en la fracción de membranas de animales tratados con el ODN control y el ODNRGS14 se

observó un aumento de las formas activas en relación a los controles, tanto del Ras-GTP con el RBD-B-Raf como de los Rap1, las isoformas 1A y 1B, y Rap2 con el RBD-RalGDS (Figura 38. Diagrama de barras).

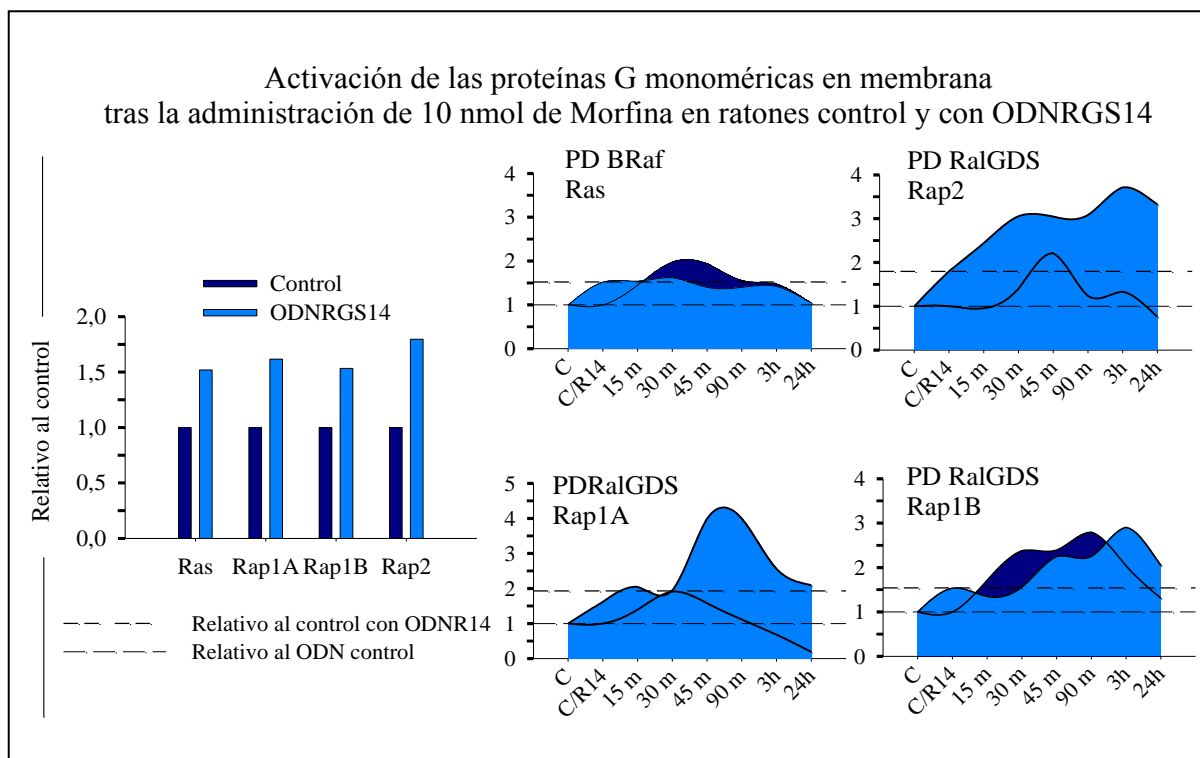


Figura 38. Activación de las proteínas G monoméricas tras la administración de morfina en PAG de ratón control y tratado con ODNRGS14. Los animales recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos y 3 horas de la inyección (azul oscuro). Los ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODNRGS14. Al sexto día se les administró una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos y 3 horas de la inyección (azul claro). Membranas sinaptosomales P2 de PAG se solubilizaron con Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con el dominio RBD acoplado a agarosa del B-Raf para el Ras y del RalGDS para los Rap en estados de activación (Materiales y Métodos 2.4.1). Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar los RBD-agarosas, se separaron mediante SDS-PAGE. Se realizó la detección con anticuerpos dirigidos al Ras, Rap1 y Rap2. En el diagrama de barras se representa la activación de las proteínas G monoméricas en animales que recibieron el ODNcontrol y el ODNRGS14.

Una vez observado el aumento de activación de estas proteínas analizamos el efecto de una dosis de 10 nmol/ratón de morfina en esos niveles de activación. Los datos se compararon con los obtenidos en animales control, que no recibieron el ODNRGS14. El Ras-GTP que se precipitó no sufrió modificación significativa tras la inyección del opioide por reducir la expresión de la RGS14. Los niveles de Rap1A y el Rap1B activados aumentaron en la fracción de membrana, aunque a intervalos posteriores a los observados en animales control, las curvas aparecían desplazadas a la

derecha. La detección del Rap2 mostró una activación gradual que se mantuvo incluso a las 24 horas de la inyección de la morfina.

Nuestros resultados mostraron que la falta de la RGS14 promovió un aumento en la activación de los Rap pero no del Ras cuando se administró morfina. El efecto que tuvo sobre las MAPK se estudió mediante el análisis de la presencia de ERK1/2 y p38 y la forma fosforilada p-ERK en la membrana de PAG de animales *knockdown* tras una dosis aguda de morfina. Las membranas sinaptosomales de los animales tratados se analizaron por *Western blot* (Figura 39).

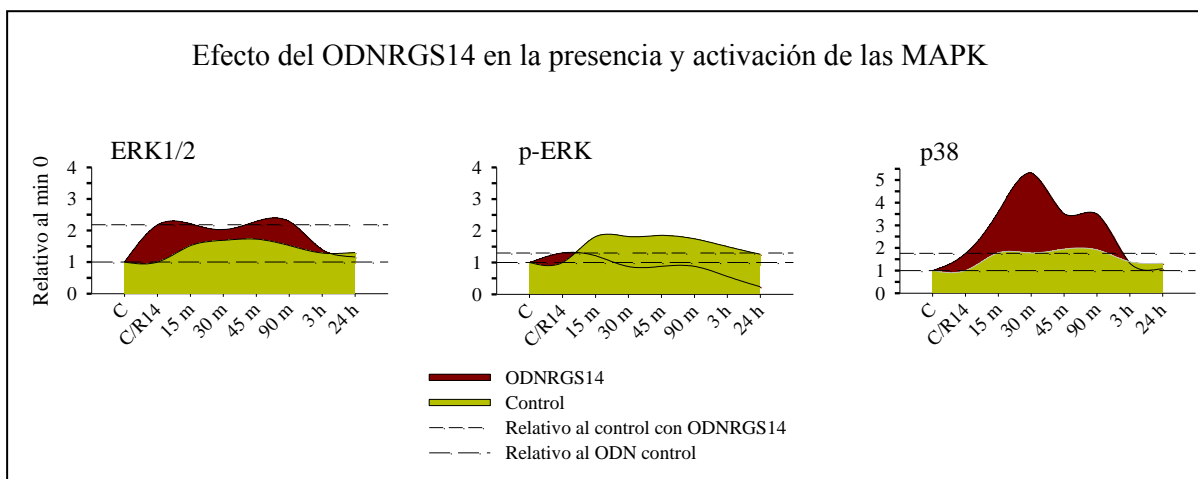


Figura 39. Presencia y activación de las MAPK tras la administración de morfina en PAG de ratón control y tratado con ODNRGS14. Los animales recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección (verde). Un grupo de ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODNRGS14. Al sexto día se les administró una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección (marrón). 40 µg de membranas sinaptosomales P2 de los PAG extraídos se separaron mediante SDS-PAGE. Se realizó la detección con anticuerpos específicos dirigidos a la ERK1/2, a su forma fosforilada (p-ERK) y a la p38.

Al reducir la RGS14 en el sistema, la ERK1/2 se traslocó a la membrana, sin embargo, la administración de morfina no incrementó estos niveles que incluso descendieron a partir de los 90 minutos. La detección de la fosforilación de las ERK1/2 también disminuyó a partir de la inyección del opioide. Sin embargo, los niveles de la p38 aumentaron considerablemente en estos animales *knockdown* en respuesta a la morfina, un efecto posiblemente causado por Rap1GTP que regula directamente a p38 (Sawada y col., 2001; Huang y col., 2004)

En los animales tratados con el ODNRGS14 había una activación basal de Ras que no se modifica cuando se estimuló el sistema con morfina. Los niveles basales de ambos Rap1 y Rap2 también aumentaron al disminuir la RGS14, tras la administración de la dosis aguda del opioide los

niveles se incrementaron aún más. Al estar asociadas a la RGS14 no sólo permanecerían en la membrana celular sino que además en el entorno del receptor MOR ya que se ha visto que su asociación tras la activación por agonista no varía. Se analizó el efecto de la reducción de la RGS en la asociación del receptor opioide con otro miembro de la cascada, el C-Raf, que además de ser activado por las proteínas de la familia de Ras puede ser fosforilado por Src (Fabian y col., 1993; Marais y col., 1995) o por PKC (Barnard y col., 1998; Schonwasser y col., 1998).

Una dosis de 10 nmol/ratón de morfina fue administrada en animales control y animales que recibieron el tratamiento con el ODN-RGS14. Se inmunoprecipitó el receptor MOR en membranas sinaptosomales de PAG y se analizó la precipitación del C-Raf por *Western blot* (Figura 40). En el grupo control, se observó un aumento de la asociación de la quinasa con el receptor que alcanzó el máximo a los 45 minutos tras la administración del opioide, los niveles a 24 horas recuperaron los basales. Los animales en los que se redujo la expresión de la RGS14, tras la administración de la morfina perdieron la asociación entre el MOR y el C-Raf.

Estos datos indicaron que la RGS14 está implicada en la retención y regulación de las proteínas de la cascada de la MAPK en la superficie celular y en el entorno del receptor opioide.

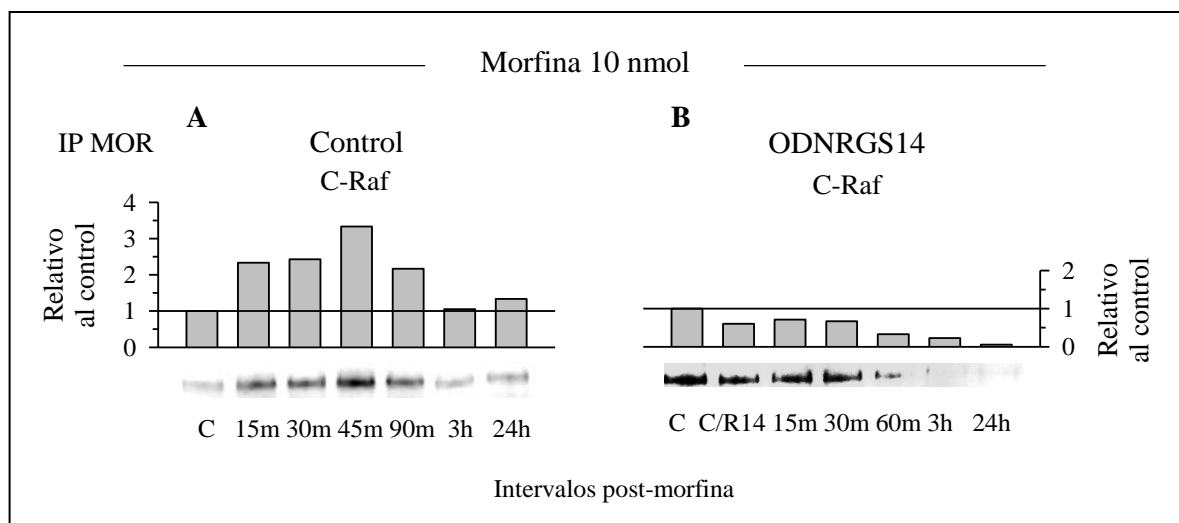


Figura 40. Asociación de C-Raf con el MOR tras la administración de morfina en PAG control y tratado con el ODNRGS14. **A.** Los animales recibieron una dosis de 10 nmol/ratón de morfina. Se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección. **B.** Un grupo de ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODN control y ODNRGS14. Al sexto día se les administró una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 60 minutos, 3 y 24 horas de la inyección. Las membranas sinaptosomales P2 de PAG de ambos grupos de animales se solubilizaron con Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. Se realizó la detección con el anticuerpo dirigido al C-Raf.

3.5. Tráfico de receptores NMDAR y AMPAR inducido por morfina

Existe una señalización cruzada entre las rutas activadas por los GPCRs, la activación de los receptores de NMDA y la vía de las MAPK. El tráfico de receptores juega un papel muy significativo en la plasticidad sináptica. Para la potenciación a la largo plazo (LTP) y la depresión a la largo plazo (LTD) de la sinapsis, los receptores de NMDA se activan promoviendo el incremento en los niveles de Ca^{2+} en la postsinapsis, desencadenando una serie de eventos que llevan al aumento o al descenso, respectivamente, en el número de receptores AMPA presentes en la sinapsis (*Luscher y col., 2000; Malinow y col., 2000; Scannevin y Huganir, 2000; Sheng y Lee, 2001*). La depotenciación/LTP y la LTD requieren la activación de los receptores NMDA que contengan NR2A y NR2B respectivamente (*Liu y col., 2004; Massey y col., 2004; Kim y col., 2005*).

Se ha visto una activación de la cascada de las MAPK tras la administración de morfina. El siguiente objetivo del estudio fue ver el efecto de una dosis de 10 nmol/ratón de morfina en el tráfico de receptores NMDAR y AMPAR. Se extrajeron los PAG de los animales tras la administración del opioide y se analizaron las membranas sinaptosomales.

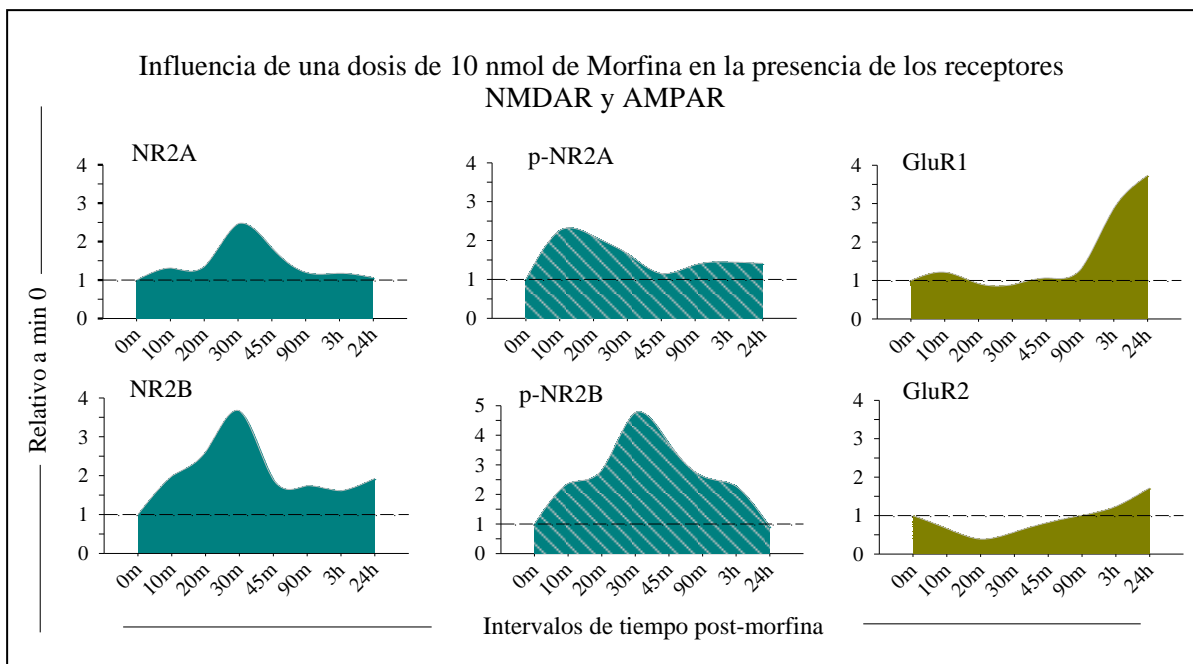


Figura 41. Presencia y activación de NMDAR y AMPAR tras la administración de morfina en PAG de ratón. Los animales recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección. 40 μ g de membranas sinaptosomales P2 de los PAG extraídos se separaron mediante SDS-PAGE. Se realizó la detección con anticuerpos específicos dirigidos frente a la NMDAR2A (NR2A), NMDAR2B (NR2B), sus formas fosforiladas pTyr1325 de la NR2A (p-NR2A) y la pTyr1472 de la NR2B (p-NR2B), GluR1 y GluR2 (que reconoce a las subunidades 2 y 3).

Por *Western blot* se estudió la variación de la presencia en membrana de las subunidades del receptor NMDAR NMDA2A (NR2A), NMDAR2B (NR2B) así como sus formas fosforiladas en los residuos de tirosina pTyr1325 de la NR2A (p-NR2A) y pTyr1472 de la NR2B (p-NR2B). También se analizaron las subunidades del receptor del AMPA GluR1 y GluR2 (Figura 41). Se observó un aumento en la presencia de las subunidades NR2A y NR2B como consecuencia de la activación opioide, así como los niveles de fosforilación de ambas proteínas. La máxima presencia de la NR2A se detectó a los 30 minutos y de su forma fosforilada 10-20 minutos tras la inyección de la morfina, en ambos casos se alcanzaron niveles entre 2 y 3 veces lo observado en el control. La NR2B y p-NR2B se detectaron en un pico máximo a los 30-45 minutos llegando a alcanzar entre 4 y 5 veces los niveles control.

La subunidad GluR1 del AMPAR mantuvo la presencia constante durante los intervalos iniciales, a partir de los 90 minutos empezó a aumentar hasta que a las 24 horas alcanzó un nivel máximo, casi 4 veces lo detectado en el control. La detección con el anticuerpo de la subunidad GluR2 reveló un descenso desde los primeros intervalos, en el minuto 90 las señales eran equiparables a las de la situación control.

La morfina promovió la activación de los NMDAR formados tanto por la subunidad NR2A como por la NR2B. Como consecuencia se detectó un descenso temprano en las subunidades GluR2 del AMPAR y un aumento en la presencia en superficie de las subunidades GluR1 a las 24 horas de la administración del opioide.

La actividad del NR2A se relaciona con la activación de Ras o Rap2 que a su vez activarían a ERK1/2 y JNK respectivamente, induciendo la liberación de las subunidades GluR1 a la sinapsis y así LTP en el primer caso, o induciendo su retirada y la depotenciación en el segundo. La activación de los receptores NMDA que contienen NR2B activarían al Rap1 y éste a la p38, promoviendo que las GluR2/3 se retiren de la sinapsis en la LTD (*English y Sweatt, 1997; Bolshakov y col., 2000; Zhu y col., 2002; 2005*).

3.6. Efecto del *knockdown* de la RGS14 en el tráfico de receptores NMDAR y AMPAR

Una vez determinado el efecto que la reducción de la RGS14 tuvo en la activación de las proteínas G monoméricas y en la presencia y activación de las MAPK, se estudió la variación de las subunidades de los receptores NMDA y AMPA. En este modelo, ras el tratamiento subcrónico con el ODNRGS14, al sexto día se les administró a los animales una dosis aguda de 10 nmol/ratón de morfina. Las membranas sinaptosomales P2 de PAG se analizaron por *Western blot*. Los resultados se compararon con los obtenidos en situación control, sin el tratamiento con el ODN (Figura 42).

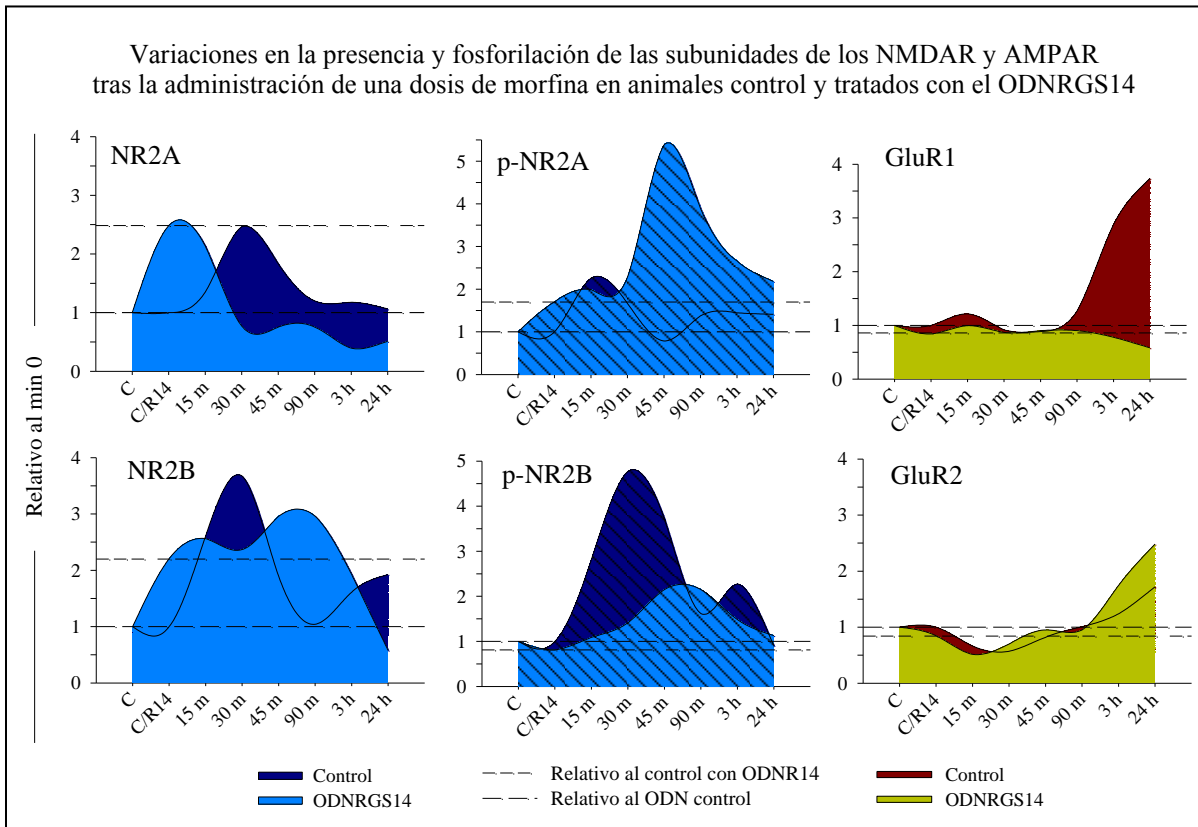


Figura 42. Presencia y activación de las MAPK tras la administración de morfina en PAG de ratón control y tratado con ODNRGS14. Los animales recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección (verde). Un grupo de ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODNRGS14. Al sexto día se les administró una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos, 3 y 24 horas de la inyección (marrón). 40 μ g de membranas sinaptosomales P2 de los PAG extraídos se separaron mediante SDS-PAGE. Se realizó la detección con anticuerpos específicos dirigidos frente a la ERK1/2, a su forma fosforilada (p-ERK) y a la p38.

La reducción de la expresión de la RGS14 tuvo como consecuencia el aumento en los niveles basales en membrana de las subunidades NR2A y NR2B, así como un aumento en la fosforilación basal de la p-NR2A. El resto de proteínas estudiadas, la forma fosforilada p-NR2B y las subunidades GluR1 y GluR2, no se vieron afectadas al disminuir la RGS.

La administración de morfina en estos animales promovió el descenso en membrana de subunidades NR2A pero también un aumento muy elevado de su forma fosforilada hasta llegar a un pico máximo a los 45 minutos tras la inyección. La subunidad NR2B mantuvo los niveles elevados en membrana aunque a las 24 horas descendieron hasta llegar a señales como las observadas en control, sin el ODN. Aunque se detectó fosforilación de esta subunidad, fue más moderada que en ratones control y trascurrido más tiempo tras la inyección.

La subunidad GluR1 se mantuvo constante en la membrana, no se produjo ninguna variación en sus niveles, a diferencia de lo observado en ratones control donde a tiempo largo los niveles de esta proteína aumentaban considerablemente. El patrón observado para la subunidad GluR2 es similar al que presentan los ratones sin ODN, aunque se detectó una tendencia a aumentar en los últimos intervalos.

4. Señalización MOR-NMDA

La señalización del MOR aumenta la actividad glutamatérgica vía NMDAR (*Heinricher y col., 2001; Kow y col., 2002*). La regulación del NMDAR se puede realizar indirectamente a través de la activación de la PKC y la Src (*Lu y col., 1999*). El SN ha desarrollado un mecanismo específico para conectar la activación del MOR con la de Src a través de la PKC y las subunidades Gai/z. La subunidad Gai/z une y estabiliza la forma inactiva de la Src hasta que la PKC activada por MOR interrumpe el complejo, la Src puede ser activada y unirse a las subunidades GaiGTP (*Sánchez-Blázquez y col., 2009*). La Src activa fosforila residuos específicos en la cola citoplasmática de las subunidades NR2A y NR2B (*Ali y Salter, 2001; Cheung y col., 2001*), aumentando la permeabilidad de los iones Ca^{2+} en el lado citoplasmático de la postsinapsis. El aumento de Ca^{2+} recluta a la calmodulina (CaM), que promueve la formación del complejo Ca^{2+} -CaM requerido para propagar la señalización.

4.1. Papel de la CaMKII

La CaMKII se activa gracias al complejo Ca^{2+} -CaM. La CaMKII activa tiene un control negativo sobre la señalización del MOR. La activación de los receptores de glutamato NMDA y la consiguiente activación de la CaMKII se ha visto que está implicada en la desensibilización inducida por morfina pero no en la evocada por DAMGO (*Bilsky y col., 1996; Fan y col., 1999; Lu y col., 2000; Tang y col., 2006; Trujillo y Akil, 1991*). Esta enzima participa en la activación de la cascada de las MAPK al fosforilar SynGAP, promoviendo su actividad GAP sobre Ras y Rap acabando así la señalización (*Oh y col., 2004; Pena y col., 2008*).

Analizamos la presencia y la activación de la CaMKII en la superficie celular tras la administración de los agonistas morfina y DAMGO en ratones control, y de morfina en animales *knockdown* de la RGS14. La subunidad α de la CaMKII se detectó como un doblete en 60 kDa que corresponde a las isoformas 1 y 2 de la proteína. Los niveles de la presencia total de la proteína CaMKII en la membrana no variaron tras la activación con agonistas opioides ni en los controles ni en animales que recibieron el tratamiento con el ODN.

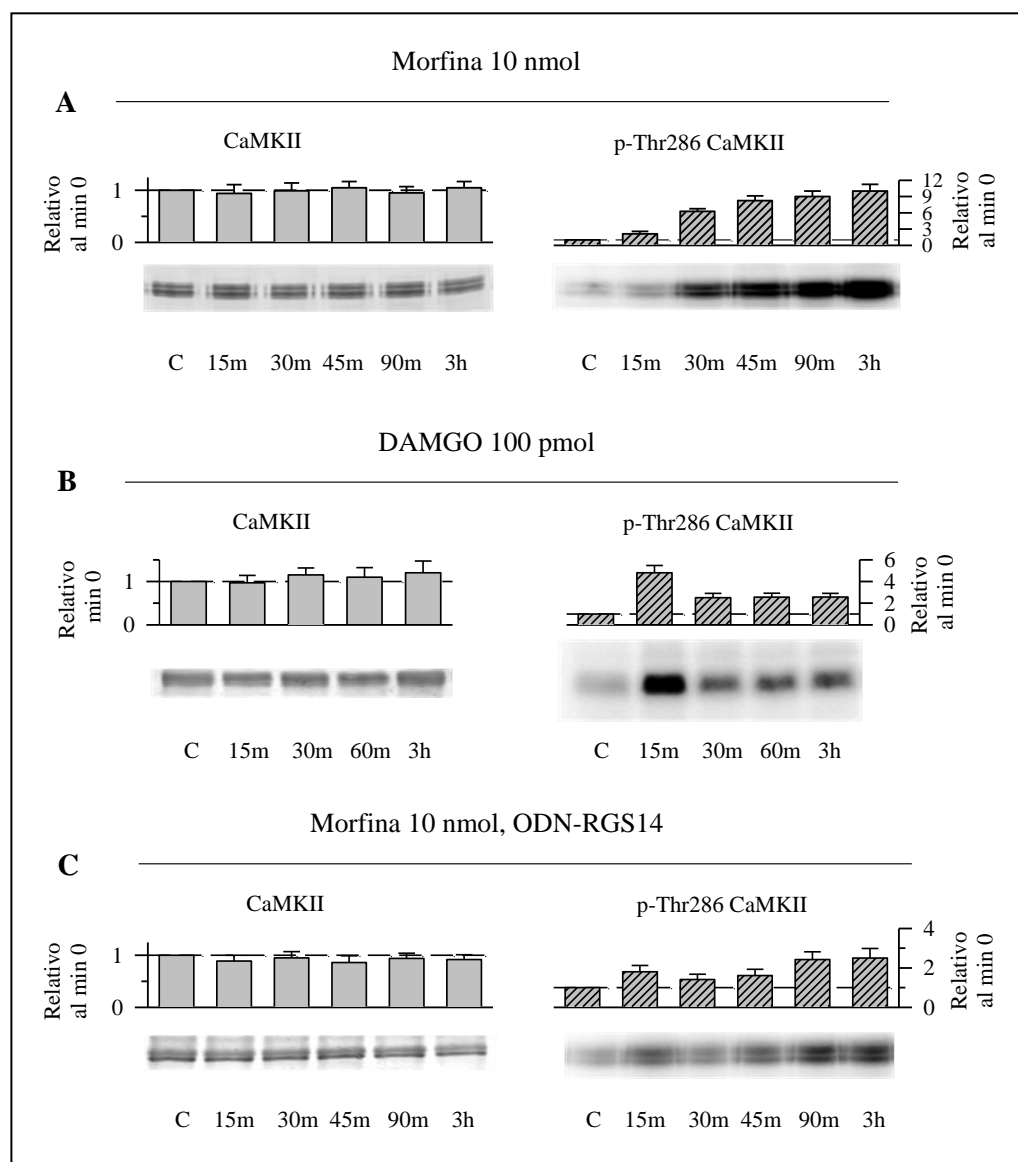


Figura 43. Presencia y activación de la CaMKII en PAG tras la activación con opioides y en animales *knockdown* para la RGS14. **A.** Los animales recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos y 3 horas de la inyección. **B.** Los animales recibieron una dosis de 100 pmol de DAMGO y se sacrificaron a los 15, 30, 60 minutos y 3 horas de la inyección. **C.** Los ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODN-RGS14. Al sexto día se les administró una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos y 3 horas de la inyección. 40 μ g de las membranas sinaptosomales de los PAG se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a la quinasa CaMKII y su forma activa fosforilada en la treonina 286 (p-Thr286 CaMKII).

Cuando se administró 10 nmol/ratón de morfina y se analizó la activación de la proteína en la fracción de membrana de los PAG de los ratones tratados, se detectó un aumento progresivo de la CaMKII activada por fosforilación en la treonina 286 desde los 30 minutos hasta las 3 horas después de la inyección, cuando los efectos analgésicos ya habían cesado (Figura 43.A). A los 15 minutos de la

administración de DAMGO se observó un fuerte aumento de la forma activa de la quinasa que disminuyó rápidamente y a los 30 minutos se recuperaron los niveles observados en situación basal (Figura 43.B). Los ratones *knockdown* de la RGS14 mostraron sólo una activación moderada de la CaMKII en respuesta a morfina (Figura 43.C).

La internalización del receptor parece interrumpir la activación de la vía NMDA-CaMKII implicada en el desarrollo de tolerancia a la morfina. La inhibición de la función del NMDA no tiene mucho efecto en la tolerancia promovida por DAMGO.

4.1. Papel de la PKC

La activación de los GPCR supone que la subunidad $G\alpha$ -GTP se separa del dímero $G\beta\gamma$. El dímero $G\beta\gamma$ promueve la liberación de DAG e IP_3 , y como consecuencia el aumento de Ca^{2+} . Estos mensajeros activan quinasas como la PI3K, que a través de Src y Ras activa a la cascada de la MAPK (Alblas y col., 1993; Crespo y col., 1994; Stoyanov y col., 1995; Hawes y col., 1996; Lopez-Illasaca y col., 1997). El estado activado de la Src como ya se ha mencionado, está afectado por las subunidades $G\alpha/i$ (Rodríguez-Muñoz y col., 2008). Src fosforila al C-Raf en tirosinas contribuyendo a su activación (Fabian y col., 1993; Marais y col., 1995). Se ha observado que H-Ras se une a través del dominio quinasa a Src e inhibe su actividad, disminuyendo la fosforilación en membrana de la NR2A (Thornton y col., 2003). La PKC también se activa por DAG y Ca^{2+} y fosforila al C-Raf en las serinas 497/499 que no son esenciales para su activación, aunque el aporte de éster de forbol que lo vinculan con las PKC tradicionales, aumenta un 30 % su activación (Barnard y col., 1998; Schonwasser y col., 1998). En el SN ciertos GPCR potencian la respuesta glutamatérgica mediada por NMDAR a través de la activación de la PKC (Chen y Huang, 1991). La traslocación de la PKC del citosol a la membrana se ha considerado como un indicador de su activación (Nishizuka, 1995).

La PKC posee un dominio regulador C1 que contiene un dominio rico en cisteína (CRD). En las isoformas convencionales (α , βI , βII , γ) y en las noveles (δ , ϵ , θ , η) este dominio está organizado como un tándem, CDR1 y CDR2, que coordina la unión de cuatro átomos de Zn^{2+} , así como la unión a ésteres de forbol o DAG (Newton, 2001). La unión de Zn^{2+} a la PKC facilita la asociación de la quinasa a los ésteres de forbol, su activación y su traslocación a la membrana plasmática (Ahmed y col., 1991; Csermely y col., 1988a, 1988b; Zalewsky y col., 1990).

El receptor MOR podría tener un papel en el paso de la enzima a la superficie celular (Narita y col., 1994). En nuestro sistema, se inmunoprecipitó al receptor MOR y se analizó la asociación con la PKC γ promovida por la activación del receptor con un agonista opioide. Tras una administración de 10 nmol/ratón de morfina se detectó el reclutamiento de la quinasa al entorno del MOR, siendo su máximo de asociación a los 45 minutos después de la inyección del opioide (Figura 44).

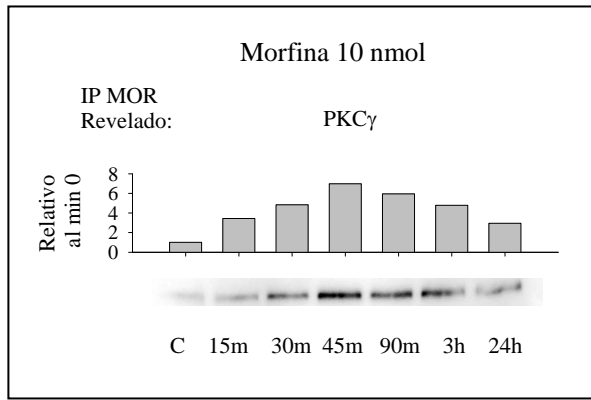


Figura 44. Asociación del MOR con la PKCγ tras la activación por morfina. Los ratones recibieron una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 45, 90 minutos y 3 horas de la inyección. Las membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron con Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con el anticuerpo frente a la PKCγ.

En las neuronas el MOR se asocia al módulo de señalización PKC γ /RGSZ que ayuda a controlar la actividad de ciertas subunidades G α . El extremo carboxilo terminal del receptor se une a la proteína de interacción de PKC (PKCI) (Ajit y col., 2007). Se estudió el papel de la proteína PKCI, también conocida como HINT1 (*Histidine triad nucleotide-binding protein*) en la señalización mediada por el MOR y específicamente en el reclutamiento de proteínas como la PKC en el entorno del receptor tras la activación por un agonista opioide.

4.2.1. Dependencia de la HINT1/PKCI

Originalmente la PKCI se describió como un potente inhibidor de la PKC (McDonald y col., 1987). Es una proteína de 126 aminoácidos que presenta una unión específica a Zn²⁺ (Pearson y col., 1990). Esta proteína pertenece a la familia de las proteínas de la tríada de histidinas, que se caracteriza por presentar la secuencia HisXHisXHis (donde X es un aminoácido hidrofóbico). La HINT1/PKCI existe como homodímero y no requiere de Zn²⁺ para asociarse (Lima y col., 1996).

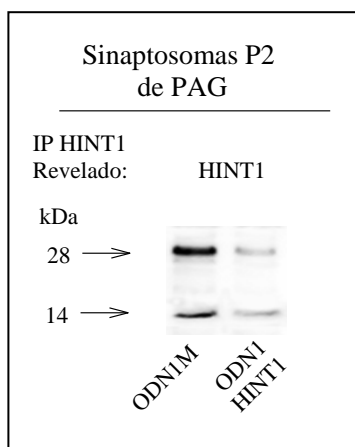


Figura 45. Inmunoprecipitación de la PKCI/HINT1 en PAG de ratón control y knockdown. Los ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODN control (ODN1M) o con el ODNHINT1 activo. Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a la HINT1. Los sobrenadantes obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a la HINT1.

Con el fin de analizar la relevancia de esta proteína en la actividad opioide se utilizaron animales mutantes KO para la HINT1 proporcionados por la *Dra. Jia Bei Wang* del departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Maryland en Baltimore, USA. También se realizaron estudios en animales KD en los que se redujo la presencia de la proteína mediante un tratamiento subcrónico con un ODN antisentido dirigido frente a la HINT1. La proteína HINT1 murina en PAG de ratón se detectó en dos bandas de 14 KDa y de 28 KDa que corresponderían al monómero y al dímero o a una forma modificada postraduccionalmente (Figura 45). Cuando se les administró a los animales ODN dirigidos al ARNm de la HINT1, se redujeron las intensidades de las dos bandas reconocidas por los anticuerpos.

Las PKC α / β I/ β II/ γ son isoformas convencionales de la quinasa que poseen los sitios de regulación por DAG, Ca²⁺ y el dominio rico en cisteína. En sinaptosomas de PAG de ratones HINT1 KO (-/-) estas isoformas no estaban alteradas (Figura 46.A). Cuando se estudió la asociación de estas quinasas con el receptor MOR en los ratones mutantes para la HINT1 no se detectó co-precipitación con las PKC α / β / γ , a diferencia de lo observado en animales control (+/+) donde sí aparecen asociadas (Figura 46.B).

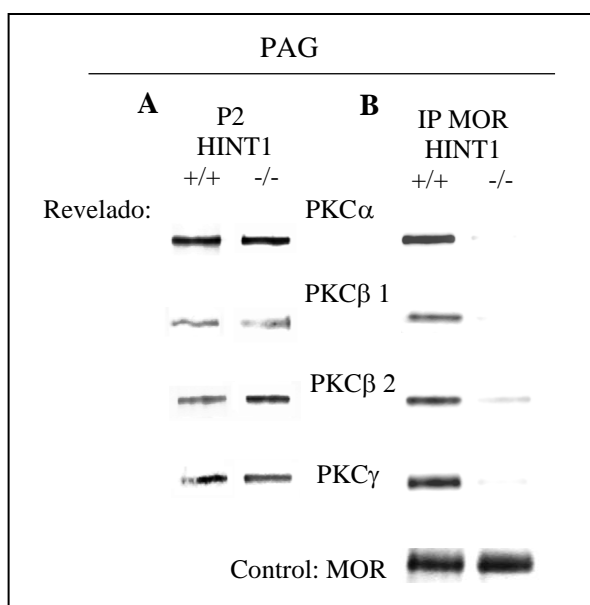


Figura 46. Presencia de diferentes isoformas de PKC y su co-precipitación con el MOR en PAG de ratón control y *knockout*. Membranas sinaptosomales de PAG de ratones control (+/+) y ratones HINT KO (-/-) se separaron mediante SDS-PAGE(A) o se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2 (B). Los sobrenadantes obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a las isoformas convencionales de la PKC α , β I, β II y γ y el MOR

Se realizaron estudios funcionales para ver el efecto de una administración de morfina en animales KD donde se ha disminuido la HINT1. Se analizó la analgesia a dosis de 3 y 10 nmol/ratón de morfina en animales que recibieron el ODN control o el ODNHINT1 (Figura 47). Se observó un aumento de la respuesta analgésica tanto para la dosis de 3 nmol como para la de 10 nmol. Cuando los animales fueron pretratados con 10 nmol de morfina, tanto el grupo de ratones control como el *knockdown* mostraron una profunda tolerancia incluso a dosis de 3 nmol.

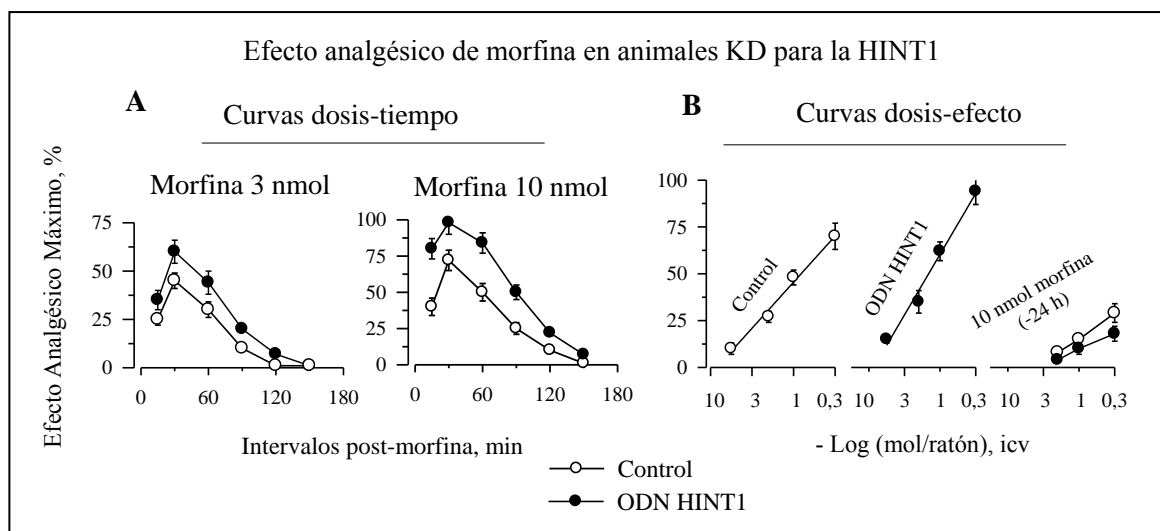


Figura 47. Influencia del ODNHINT1 en la actividad antinociceptiva de la morfina. A. Curvas dosis-tiempo obtenidas a partir de animales que recibieron un tratamiento subcrónico (durante 5 días) con el ODNM (Control) o con el ODN activo. Al sexto día se les administró 3 o 10 nmol/ratón de morfina vía icv y se determinó la analgesia a varios intervalos empleando el test de *tail-flick*. B. Curvas dosis-efecto obtenidas a partir de animales que recibieron un tratamiento subcrónico (durante 5 días) con el ODNM o con el ODN activo. Al sexto día se les administraron dosis de 10, 3, 1 o 0,3 nmol/ratón de morfina (expresadas como $-\text{Log}$ (moles)). Se inyectaron los agonistas vía icv a los ratones y se determinó la analgesia 30 minutos después empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

4.2.1.1. Efecto de la ausencia de PKCI en la señalización del MOR

Se ha visto que una administración icv de morfina promueve el reclutamiento de la PKC γ al receptor. Para determinar la influencia de la HINT1 en los efectos analgésicos de la morfina, se estudió el receptor μ y la transducción asociada a él en la fracción sinaptosomal de PAG de ratones control y *knockdown* para la HINT1.

Los ratones fueron inyectados con 10 nmol de morfina, se sacrificaron en varios intervalos post-administración y se extrajo el PAG. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con las muestras y se analizó al receptor y sus proteínas asociadas (Figura 48). Una dosis de 10 nmol como se ha descrito no promueve una significativa pérdida de receptores de membrana aunque sí produjo una fosforilación detectable en serinas del receptor. La coprecipitación del MOR con el doblete de la HINT1 no se alteró con el tratamiento con morfina, aunque sí que aumentó la asociación de la PKC γ desde los primeros intervalos estudiados y se mantuvo incluso 24 horas después de la inyección. El receptor también apareció asociado a PKC α , a los 15 minutos mostró su máximo de asociación que rápidamente cedió.

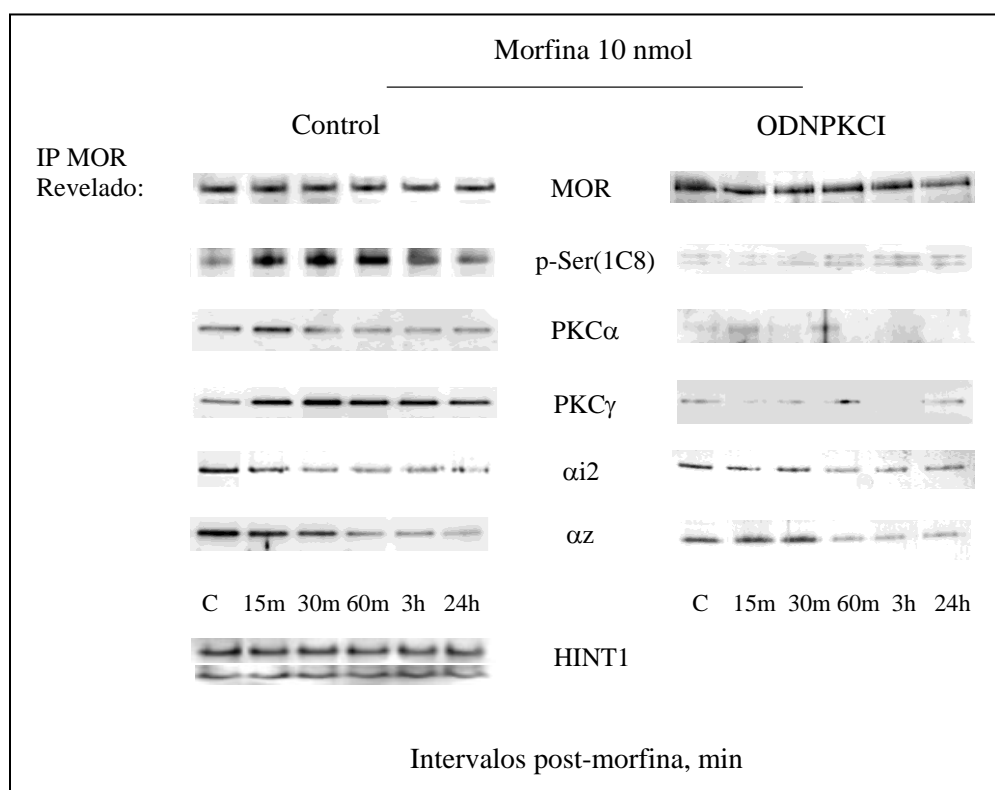


Figura 48. Inmunoprecipitación del MOR en PAG de ratón control y *knockdown* para la HINT1 tras activación con morfina. Los ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODNHINT1. Al sexto día se les administró una dosis de 10 nmol de morfina y se sacrificaron a los 15, 30, 60 minutos, 3 y 24 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente al MOR, a la p-Ser(1C8), a la quinasas PKC α y γ , a las subunidades G α i2 y z, y a la HINT1.

En ratones *knockdown* para la HINT1 la morfina siguió sin promover la pérdida del MOR de la membrana, aunque sí que dejó de verse la fosforilación en serinas del receptor y el reclutamiento de las PKC a su entorno. En ambas situaciones se observó la pérdida de subunidades G α i2/z, tras su activación fue capaz de promover la separación de las proteínas G que pueden alcanzar así a sus efectores. Por todo ello la PKCI parece ser una pieza clave en la señalización mediada por el receptor donde aparece implicada la PKC, determinando la capacidad de ésta de asociarse al MOR tras la activación del receptor.

4.2.1.2. Influencia del Zn²⁺

Se exploró la influencia del Zn²⁺ en el reclutamiento de las isoformas de la PKC al MOR. Los iones zinc se asocian con el grupo sulfidrilo de las cisteínas con el nitrógeno imidazocil de las

histidinas o con el carboxilo de aspárticos y glutámicos (Vallee y Auld, 1993). Membranas sinaptosomales de ratón se solubilizaron en un tampón con Nonidet NP40 1 % y se les añadió concentraciones crecientes de $ZnCl_2$: 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 100 μ M y 1 mM. Se incubaron 4 horas a 4° C tiempo durante el cual el ión Zn^{2+} libre pudo actuar. Tras ese tiempo se realizó la inmunoprecipitación del MOR y se analizó por SDS-PAGE la asociación de las diferentes PKC (Figura 49). El Zn^{2+} aumentó la asociación del MOR con las PKC convencionales (α , β , γ) pero no con las noveles (δ , ϵ , θ , η) o las atípicas (τ/λ). La PKC γ fue la isoforma que mejor respondió al Zn^{2+} , correspondiendo a las observaciones *in vivo* donde las isoformas compiten por su unión al complejo HINT/RGSRZ. El aporte de iones zinc libres tuvo un efecto bifásico en la unión de la PKC al MOR aumentando a concentraciones nM y disminuyendo a partir del rango μ M.

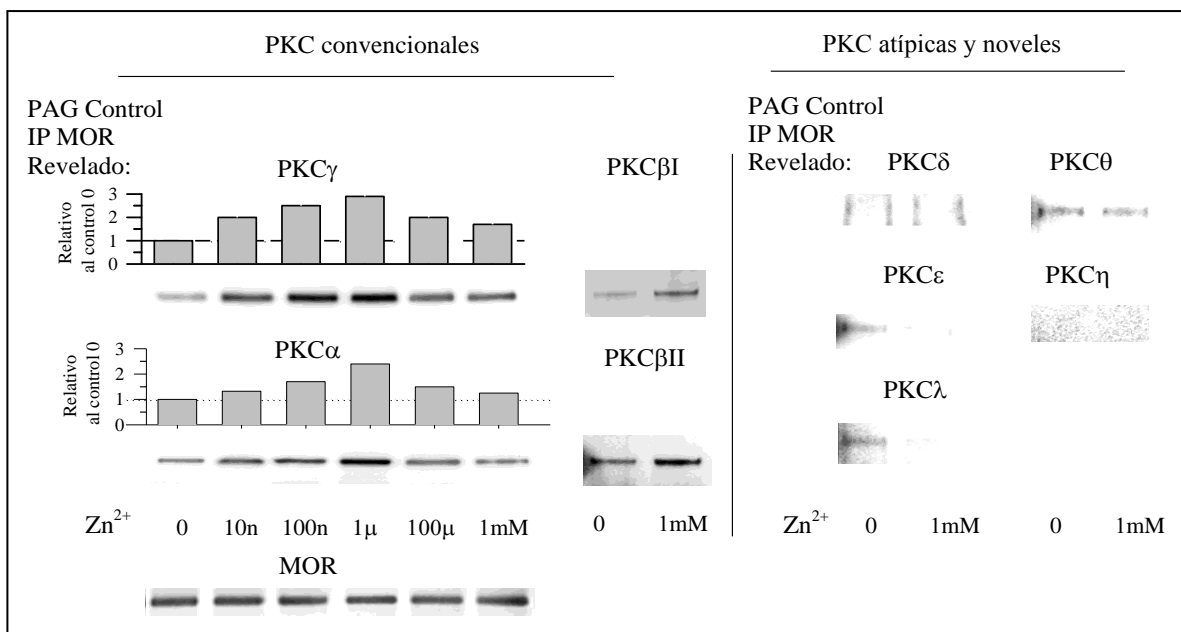


Figura 49. Efecto del aporte de Zn^{2+} en el reclutamiento de las PKC en el entorno del MOR en PAG de ratón. Membranas sinaptosomales de corteza se solubilizaron en Tris/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se incubaron con concentraciones crecientes de Zn^{2+} durante 4 horas a 4°C. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron en mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos de las quinasas PKC: α , β I, β II, γ , δ , ϵ , θ , η , y λ .

Se ha visto que la HINT1 interacciona con el dominio regulador de la PKC β en el sistema de los dos híbridos (Lima y col., 1996). Por tanto, los CRD de las PKC convencionales son sitios candidatos para interaccionar con el complejo HINT1/RGSRZ unido al MOR. Para estudiar esta posibilidad se emplearon inhibidores de la PKC que interaccionan con diferentes regiones de su secuencia. La cheleritrina y el Gö7874 se unen a la región del sustrato o a la de unión del ATP respectivamente, la calfofistina se une al CRD y altera su estructura (Kazanietz y col., 1995; Herbert y col., 1990).

Las membranas sinaptosomales se solubilizaron y se incubaron con calfofina C 50 nM, Gö7874 4 nM o cheleritrina 0,7 μ M. Tras una hora a 4°C se añadió el $ZnCl_2$ 100 nM y se dejaron las muestras 4 horas a 4°C con agitación. Se realizó la inmunoprecipitación con el MOR y se detectaron por *western blot* las PKC α y γ . De los tres inhibidores, en presencia de Zn^{2+} , sólo la calfofina impidió la asociación de la PKC con el MOR (Figura 50).

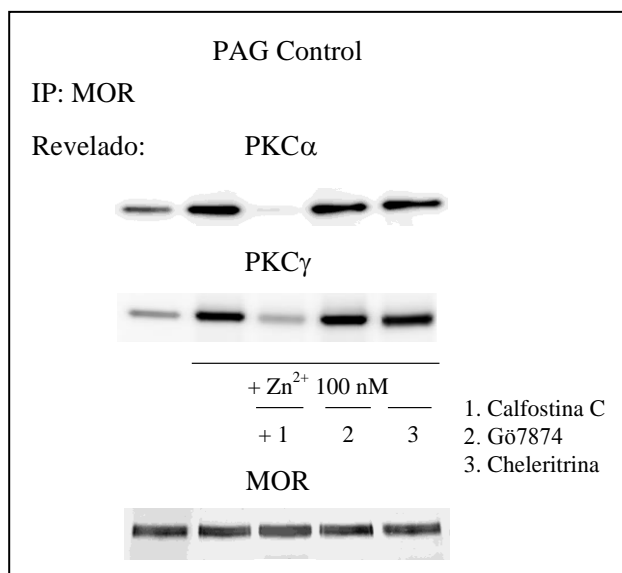


Figura 50. Efecto del aporte de Zn^{2+} e inhibidores de la PKC en su asociación al MOR. Membranas sinaptosomales de corteza se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se incubaron con los inhibidores de la PKC: calfofina C 50 nM, Gö7874 4 nM y cheleritrina 0,7 μ M durante 1 hora a 4°C. Pasado ese tiempo se les añadió Zn^{2+} 100 nM durante 4 horas a 4°C. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a las quinasas PKC α y γ y el MOR.

El efecto del Zn^{2+} dependería de la región reguladora C1 y C2 de la PKC de forma que al estar la calfofina presente el ión no puede unirse allí y mediar el reclutamiento de la quinasas al receptor. Ese dominio regulador es donde se unen el DAG y el Ca^{2+} , por lo que estudiamos si la adición de estas moléculas también interferiría en el aumento o el descenso de la asociación de la PKC inducida por el Zn^{2+} .

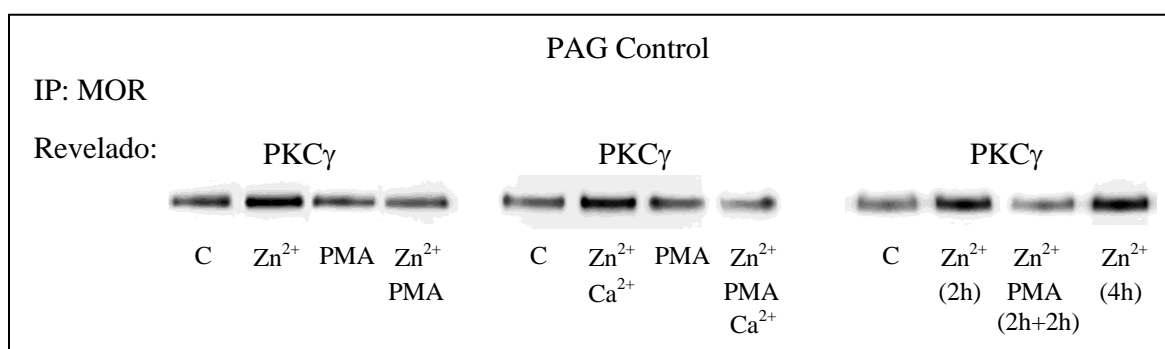


Figura 51. Reversión del efecto del Zn^{2+} debido a PMA y Ca^{2+} . Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se solubilizaron y se incubaron con $ZnCl_2$ 100 nM o/y con PMA 0,5 μ M (A); con $ZnCl_2$ 100 nM, PMA 0,5 μ M o/y $CaCl_2$ 100 μ M (B) durante 4 horas a 4°C. C. La incubación se hizo con $ZnCl_2$ durante 2 horas y luego se añadió el PMA durante otras 2 horas. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con el anticuerpo específico de la quinasas PKC γ .

Las membranas P2 del PAG solubilizadas se incubaron con ZnCl_2 100 nM, ésteres de forbol (PMA) 0,5 μM y CaCl_2 100 μM durante 4 horas a 4°C. La exposición a PMA en presencia (Figura 51.A) o ausencia (Figura 51.B) de Ca^{2+} redujo la asociación inducida por zinc de la PKC al receptor. El Ca^{2+} solo fue insuficiente para revertir el efecto del Zn^{2+} . También se comprobó que los tiempos de incubación no determinaban el efecto del PMA. Se realizó una incubación con el Zn^{2+} de 2 horas, tras ese tiempo se añadió el PMA y se dejaron 2 horas más. Pasadas las 4 horas se estudió la asociación de la PKC al MOR y el PMA siguió interfiriendo en el reclutamiento y el Zn^{2+} en ambos intervalos lo promovió (Figura 51.C).

Para determinar si los efectos observados se debían realmente al ión Zn^{2+} liberado, se repitieron los ensayos pero añadiendo al medio quelantes de iones. Las membranas sinaptosomales se solubilizaron y se les añadió en el mismo momento ZnCl_2 100 nM y los quelantes 1,10 fenantrolina en concentraciones crecientes de 100 μM a 3 mM y N,N,N',N'-tetrakis(2-piridimetil)etilendiamina (TPEN) de 1 a 100 μM . Se dejó un tiempo de incubación de 4 horas a 4°C y se realizó la inmunoprecipitación con el receptor MOR.

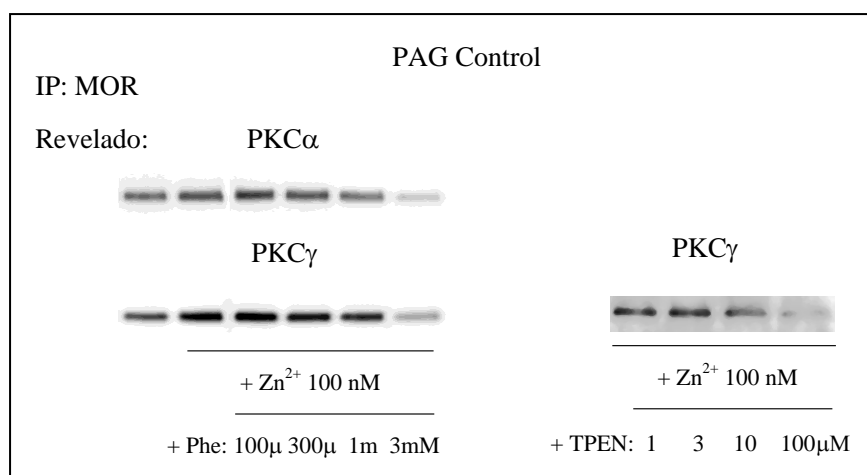


Figura 51. Reversión del efecto del Zn^{2+} debido a quelantes de iones. Membranas sinaptosomales de corteza se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se incubaron con Zn^{2+} 100 nM; 1,10 fenantrolina a 100 μM , 300 μM , 1 mM y 3 mM; y N,N,N',N'-tetrakis(2-piridimetil)etilendiamina (TPEN) de 1, 3, 10 y 100 μM durante 4 horas a 4°C. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a las quinasas PKC α y PKC γ .

La presencia de los quelantes de iones 1,10 fenantrolina y TPEN también antagonizó el reclutamiento de las PKC al receptor promovido por el aporte de Zn^{2+} (Figura 51). La asociación de la quinasa con el receptor fue disminuyendo a medida que se aumentaba la concentración de quelante. Al retirar el ión del medio se disminuyó su efecto en el sistema.

4.2.1.3. Fuente fisiológica de Zn^{2+}

La actividad sináptica lleva a la liberación de glutamato y Zn^{2+} de las vesículas sinápticas, este ión metálico entra en las neuronas postsinápticas a través de receptores ionotrópicos de Ca^{2+} como los NMDAR, AMPAR o canales de calcio dependientes de voltaje (*Gundelfinger y col., 2006*). Este mecanismo y el hallazgo de que el MOR potencia la respuesta de NMDAR mediada por glutamato (*Chen y Huang, 1991*), nos llevó a investigar la cascada del NMDAR-óxido nítrico (NO) como posible fuente de este metal para inducir el reclutamiento de $PKC\gamma$ al receptor por la activación de morfina.

Los iones Zn^{2+} libres pueden ser movilizados de su almacenamiento intracelular como las metalotioneínas (MT), pequeñas proteínas de 3 KDa que pueden unir hasta 7 átomos de Zn^{2+} a través de residuos de cisteínas. El NO puede liberar el Zn^{2+} de esas proteínas por nitrosilación de esas cisteínas (*Frederickson y col., 2005*). La estimulación de NMDAR en neuronas activa la sintasa neural del óxido nítrico y esto puede contribuir a la generación de Zn^{2+} libre necesario para reclutar la $PKC\gamma$ a los MOR activados por morfina.

Para estudiar el efecto que el NO libre podría tener en nuestro sistema se incubaron las membranas sinaptosomales de PAG con los donantes de NO (S)-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) y (\pm)-(E)-etil-2-[(E)-hidroximino]-5-nitro-3-hexenamida (NOR-3). Tras un la incubación de 4 horas a 4°C se realizó la inmunoprecipitación con el MOR y se analizó por SDS-PAGE la asociación con las PKC (Figura 52).

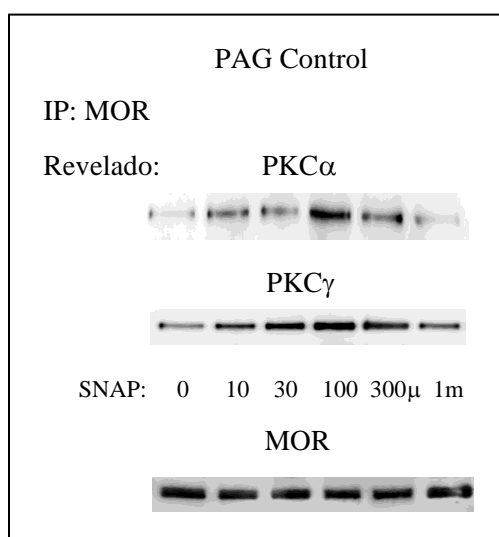


Figura 52. Efecto del donante de NO en el reclutamiento de las PKC en el entorno del MOR en PAG de ratón. Membranas sinaptosomales de corteza se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se incubaron con concentraciones crecientes del donante de NO SNAP o/n a 4°C. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2. Los sobrenadantes obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos de las quinasas PKC α y γ y el MOR.

La adición de donantes de NO a membranas sinaptosomales tuvo un efecto bifásico en la asociación del MOR con las PKC, aunque la $PKC\gamma$ se detectó con mayor intensidad y los cambios se apreciaron más claramente. Estos efectos se debieron tanto al SNAP como al NOR-3 aunque éste último fue menos potente.

5. Sistema cannabinoide.

Los receptores opioides y cannabinoides pertenecen a la misma familia, los GPCR. La activación de estos receptores induce respuestas como la analgesia, euforia y un descenso en la motilidad intestinal (*Dhawan y col., 1996; Howlett, 2002*). Ambos receptores muestran similitudes en los mecanismos de transducción de la señal y su farmacología (*Martin y col., 1994; Pertwee, 1997*). Estudios de comportamiento han demostrado una interacción funcional entre CB1R y MOR (*Ríos y col., 2006*).

Los opioides no parecen estar implicados en la modulación de los niveles basales de antinocicepción, donde sí tendrían un papel los cannabinoides (*Richardson y col., 1998*). Puede haber estados de dolor en los que no se responde a opioides pero que son aliviados mediante el tratamiento con cannabinoides. En este sentido se ha visto que el dolor neuropático que responde débilmente a opioides, remite con el uso de cannabinoides (*Herzberg y col., 1997*).

Los efectos analgésicos supraespinales de opioides y cannabinoides administrados vía icv están mediados por la unión a sus respectivos receptores, MOR y CB1R, en el cerebro medio (*Hohmann y Suplita, 2006; Herkenham y col., 1991; Lichtman y col., 1996; Mansour y col., 1988; Yaksh y col., 1976*).

5.1. Analgesia y tolerancia producida por cannabinoides

Se realizó un estudio funcional para analizar el efecto analgésico producido por diferentes dosis de cannabinoides administradas vía icv en ratones control. Los agonistas utilizados fueron el compuesto químico WIN55,212-2 y los derivados sintéticos de endocannabinoides metanandamida y ACEA. Se administraron las siguientes dosis de agonistas vía icv: metanandamida 3 o 50 nmol/ratón; ACEA 3, 10 o 40 nmol/ratón; y WIN55,212-2 0,2, 4 o 20 nmol/ratón. Estas administraciones produjeron en los animales una antinocicepción dosis-dependiente en el test de la retirada de la cola (Figura 53).

Los efectos analgésicos tuvieron un pico máximo a los 8 minutos tras la inyección, a partir de ese momento se produjo un descenso progresivo de la analgesia hasta que a los 60-120 min dejó de detectarse. La dosis de 50 nmol de metanandamida, 40 nmol de ACEA o 20 nmol de WIN55,212-2 produjeron un efecto comparable, que se correspondía al 70 % del EAM observado en este test.

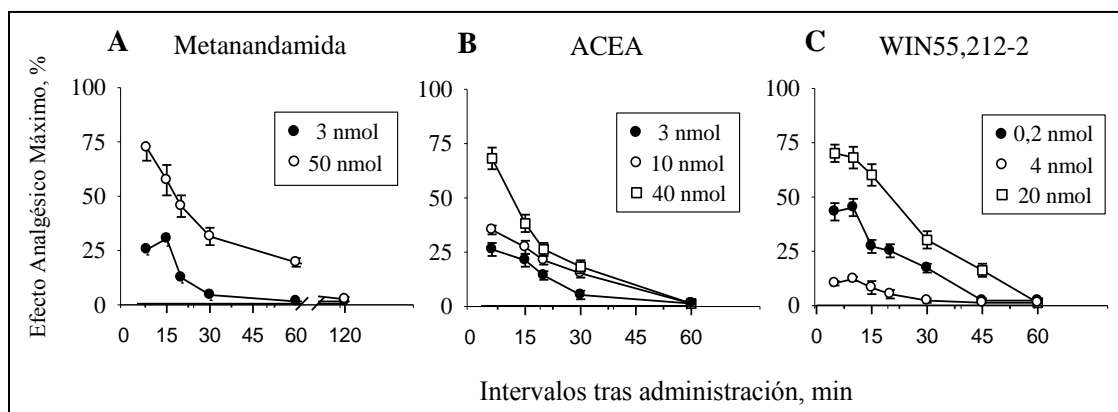


Figura 53. Analgesia inducida por agonistas cannabinoides. Curvas dosis-efecto obtenidas tras la administración de 3 y 50 nmol/ratón de Metanandamida (A); 3, 10 y 40 nmol/ratón de ACEA (B) y 0,2, 4 y 20 nmol WIN55,212-2 (C). Se inyectaron los agonistas vía icv a los ratones y se determinó la analgesia a varios intervalos empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

Como se ha visto la exposición continuada a agonistas activa de forma prolongada a los GPCR disminuyendo su respuesta celular, promoviendo su desensibilización. En este sentido se ha descrito que la respuesta a cannabinoides desensibiliza rápidamente al receptor tanto *in vitro* como *in vivo* (Pertwee, 1997). Estudios con cannabinoides mostraron que su administración repetida lleva al rápido desarrollo de tolerancia tanto en humanos como en animales (Jones y col., 1981; Hollister, 1986; Abood y Martin, 1992; Martin y col., 1994).

La tolerancia a una única dosis de cannabinoides se comprobó tras la administración de una inyección aguda de estos agonistas. En nuestro estudio analizamos el efecto de una sola dosis de metanandamida 50 nmol/ratón, ACEA 40 nmol/ratón o WIN55,212-2 20 nmol/ratón observando una profunda desensibilización. Una segunda dosis similar a la primera de esos cannabinoides 24 horas después de la inicial produjo una reducción de la analgesia del 70 % del EAM a menos del 20 % (Figura 54).

Estudios previos mostraron que la tolerancia a opioides como la morfina se revertió cuando se inhibió la actividad de la quinasa PKC (Garzón y col., 2008). Debido a las similitudes de ambos sistemas se comprobó si con el uso de inhibidores de PKC también revertía la tolerancia a los cannabinoides. Los animales recibieron una dosis aguda de metanandamida, ACEA o WIN55,212-2, a las 24 horas se les administró 1 nmol de Gö7874, un inhibidor de la PKC, y 30 minutos después fueron inyectados con una segunda dosis similar a la primera de los agonistas. En este caso, a diferencia de lo observado para los opioides, el descenso de la analgesia no se vio afectado al inhibir a la PKC.

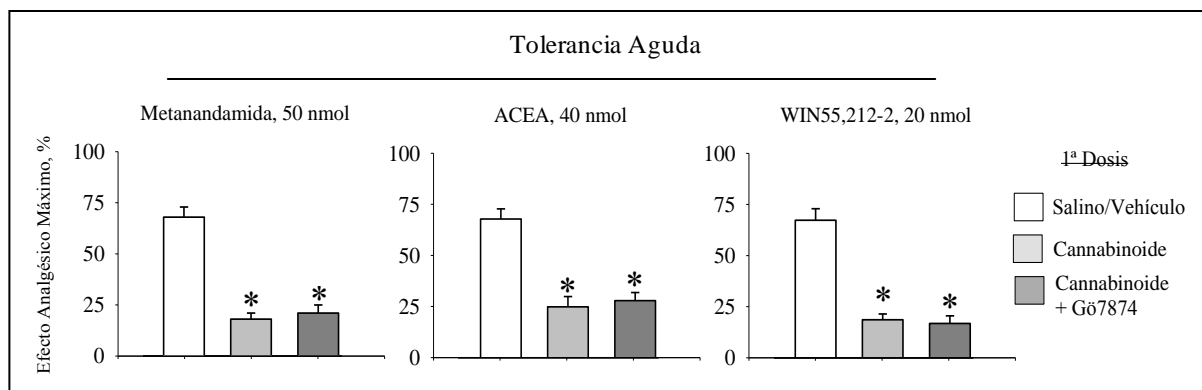


Figura 54. Tolerancia aguda tras la administración de agonistas cannabinoides. Los animales recibieron una administración inicial de metanandamida 50 nmol/ratón; ACEA 40 nmol/ratón y WIN55,212-2 20 nmol/ratón (barras blancas) y una segunda dosis de cannabinoides similar a las 24 horas después de que ratones recibieran la primera dosis (barras grises). Se inyectaron los agonistas vía icv a los ratones y se determinó la analgesia 10 minutos después de la administración del agonista empleando el test de *tail-flick*. También se les administró a los animales el inhibidor de quinasa PKC Gø7874 (1 nmol/ratón) 30 minutos antes de la segunda dosis (barras grises oscuras). La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Diferencias significativas respecto al grupo que recibió salino/vehículo ($P < 0.05$).

Se ha observado un progresivo descenso de la presencia del receptor CB1 y de la actividad de las proteínas G estimuladas por estos receptores tras una administración crónica de Δ^9 -THC o WIN55,212-2. En un estudio se examinó el curso temporal para la recuperación de la tolerancia a Δ^9 -THC administrado durante 6 días y medio. Los ratones permanecieron tolerantes hasta 7 días y medio tras el tratamiento (*Bass and Martin, 2000*). Sim-Selley y colaboradores determinaron que la actividad del CB1R y de las proteínas G asociadas se recuperó tras 7 días en el estriado y a los 14 días en el hipocampo (*Sim-Selley y col., 2006*).

Analizamos el tiempo de recuperación de la analgesia en ratones que habían recibido una dosis aguda de metanandamida, ACEA o WIN55,212-2. Esos animales se dividieron en grupos y cada grupo recibió una segunda dosis a diferentes intervalos durante los 20 días posteriores a la primera inyección. Se analizó el efecto analgésico mediante el test de la retirada de la cola. Se observó que la desensibilización causada por una única dosis de los cannabinoides se mantuvo durante varios días para los tres agonistas, y no se recuperó la respuesta del 70 % del EAM hasta pasadas 2 ó 3 semanas. Esto muestra claras diferencias con la morfina cuya recuperación de la respuesta analgésica se detectó a los 3 ó 4 días (Figura 55).

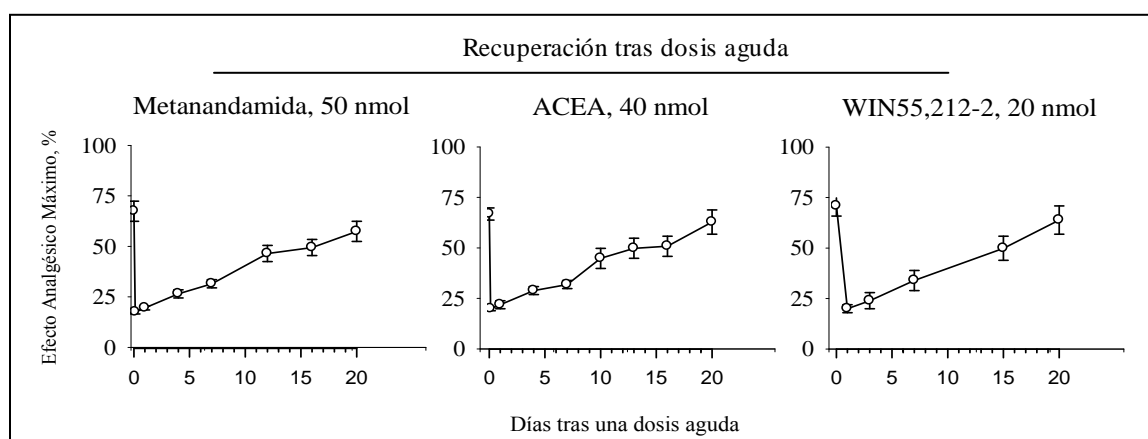


Figura 55. Recuperación de la respuesta analgésica tras la administración aguda de agonistas cannabinoides. Los animales recibieron una administración inicial de metanandamida 50 nmol/ratón; ACEA 40 nmol/ratón y WIN55,212-2 20 nmol/ratón. Una segunda dosis de cannabinoides similar a la primera se fue administrando 1, 4, 7, 12, 16 o 20 días después. Se inyectaron los agonistas vía icv a los ratones y se determinó la analgesia 10 minutos después de la administración del agonista empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones.

5.2. Detección del receptor CB1R

El CB1R es un receptor de 472 aminoácidos presente en el SNC. Como GPCR posee siete dominios transmembrana con un extremo amino terminal extracelular y un carboxilo terminal citosólico. Se ha descrito que una de las modificaciones postraduccionales del CB1R es la glicosilación (Song y Howlett, 1995). Al analizar su presencia en tejido nervioso mediante SDS-PAGE y *Western Blot* se han detectado, además de la correspondiente al peso teórico, bandas de peso molecular superior (Pettit y col., 1998; Egertová y Elphick, 2000). Este patrón característico de bandas en “escalera” aparece como resultado de una alteración en la migración electroforética debida a los azúcares presentes en el receptor.

Para la detección del CB1R en nuestro sistema de estudio se desarrollaron dos anticuerpos, uno que reconocía una secuencia peptídica del extremo amino terminal (Nt) del aminoácido 53 al 66; y otro frente a una secuencia del primer bucle extracelular (E1), del aminoácido 177 al 188. Estos anticuerpos fueron purificados por afinidad utilizando la correspondiente secuencia antigénica. La eficiencia de estos anticuerpos se comprobó inmunoprecipitando con uno, Nt y E1; y revelando con otro, E1 y Nt respectivamente, en una muestra enriquecida en proteínas glicosiladas (Materiales y métodos 2.5.3) y en membranas sinaptosomales de PAG de ratón. El peso molecular teórico basado en la secuencia aminoacídica correspondería a 53 kDa. Nuestros anticuerpos dieron un marcaje en “escalera” en bandas correspondientes a 52, 60, 75, 100 y 150 kDa principalmente. Su especificidad se determinó por *Western blot* observando el marcaje de un fragmento del receptor CB1R recombinante

correspondiente a los primeros 110 aminoácidos (CB1R 1-110aa-GST). Sólo el anticuerpo que reconoce el extremo amino terminal marcó al fragmento recombinante (Figura 56).

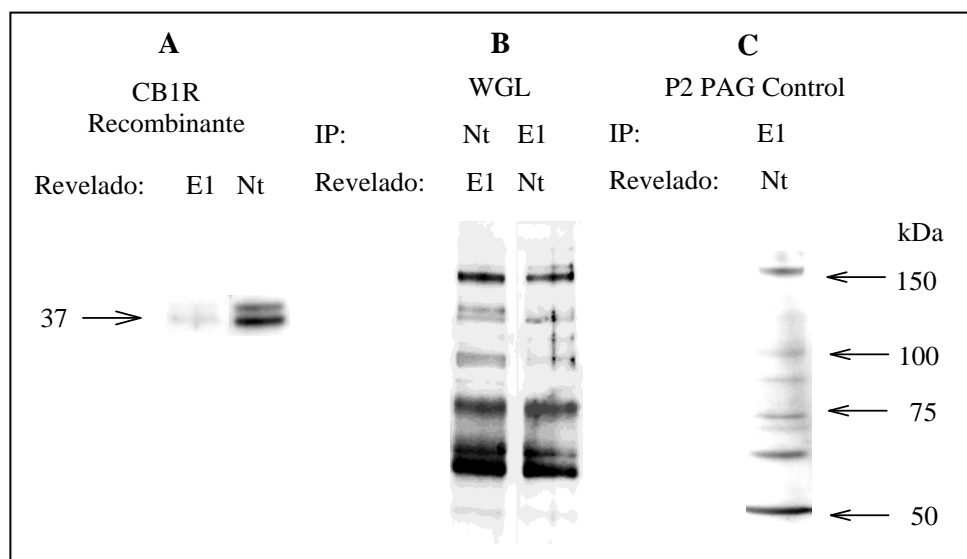


Figura 56. Detección del receptor CB1R en tejido neural. A. La proteína recombinante CB1R (1-110 aa)-GST se separó por SDS-PAGE. B. Las proteínas glicosiladas de cerebro ratón se purificaron mediante una columna de *Wheat Germ Lectin* (WGL) y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al extremo amino terminal (Nt, 53-66 aa) y al primer bucle extracelular (E1, 177-188 aa). C. Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturalizantes y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al E1. Los complejos proteicos obtenidos de las inmunoprecipitaciones, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. Las detecciones se realizaron con los anticuerpos específicos frente al receptor CB1R: Nt y E1.

5.3. Internalización del CB1R

La desensibilización/resensibilización a veces está estrechamente ligada a los procesos de internalización/reciclaje del receptor. Los agonistas cannabinoides inducen una rápida internalización del CB1R por un mecanismo dependiente de clatrina y donde participan la GRK3 y la β -Arrestina 2. (Rinaldi-Carmona y col., 1998; Hsieh y col., 1999; Jin et al. 1999; Coutts y col., 2001; Kouznetsova y col., 2002). El extremo carboxilo terminal tiene un papel en este proceso, en partículas los residuos del 460-463 (Hsieh y col., 1999).

Debido a la profunda tolerancia observada con la administración icv de los cannabinoides se analizó la posible correlación con un descenso en la presencia del receptor CB1 en la superficie celular. La internalización del CB1R mediada por agonista se estudió en animales a los que se les había administrado una dosis aguda de metanandamida, ACEA o WIN55,212-2. Los animales se sacrificaron a diferentes intervalos de tiempo tras las inyecciones y se preparó la fracción sinaptosomal

y citosólica de los PAG extraídos. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en condiciones desnaturizantes para estudiar la presencia del receptor CB1R en ambos compartimentos.

Tras la inyección de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2 se observó un descenso de los receptores de membrana desde los primeros 10 minutos siendo el máximo a los 30, a partir de ese momento el receptor volvió a aumentar. En la fracción citosólica la presencia del CB1R aumentó alcanzando un pico a los 30 minutos. Pasadas 24-48 horas se recuperaron los niveles basales de receptores en los dos compartimentos.

Una dosis de 40 nmol/ratón de ACEA también indujo una rápida internalización del receptor en los primeros minutos tras la administración del agonista, dejando de ser detectable en la membrana y apareciendo en el citosol. La metanandamida produjo poca internalización del CB1R, manteniéndose los niveles de receptor en membrana y en citosol similares a los observados en situación control (Figura 57).

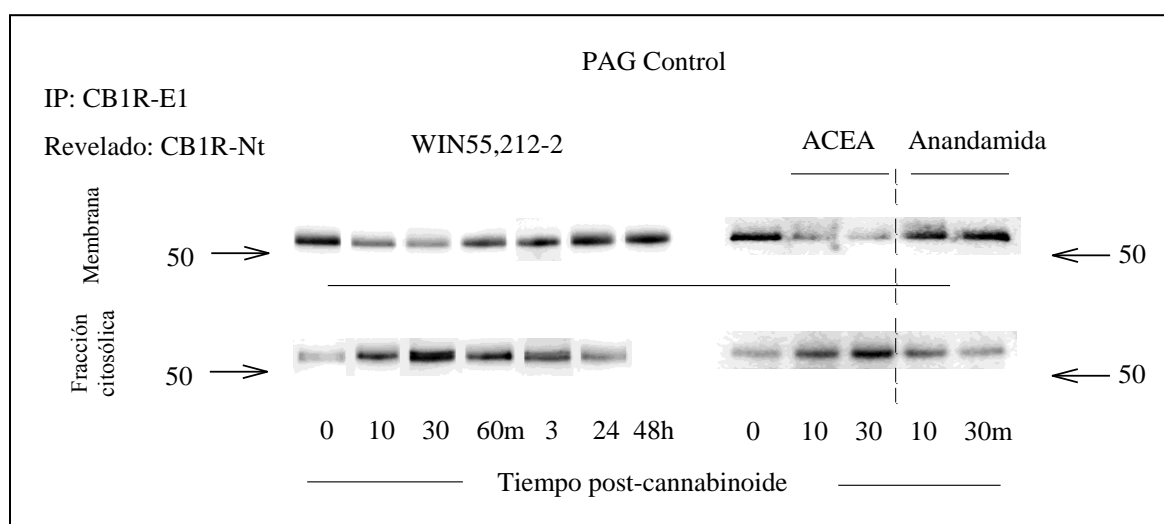


Figura 57. Influencia de cannabinoides en la presencia del CB1R en superficie y citosol de neuronas de PAG de ratón. Los animales recibieron una dosis de 50 nmol/ratón de metanandamida, 40 nmol/ratón de ACEA y 20 nmol/ratón de WIN55,212-2. Se sacrificaron a los 10, 30, 60 minutos, 3, 24 y 48 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales o fracción citosólica de PAG se solubilizaron con SDS en condiciones desnaturizantes. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al CB1R-E1. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. Los receptores se detectaron con el anticuerpo dirigido frente al CB1R-Nt.

5.3.1. Subfraccionamiento celular tras el tratamiento con WIN55,212-2

Se ha documentado que el CB1R se encuentra expresado principalmente en la superficie celular (Hsieh y col., 1999), pero también se acumula intracelularmente en ausencia de ligando. Este hallazgo

se ha atribuido a la capacidad del CB1R de internalizarse de forma constitutiva (*Leterrier y col., 2004*). La administración de WIN55,212-2 promovió que la presencia del receptor en las fracciones lisosomales y de endosomas tempranos aumentara (*Tappe-Theodor y col., 2007*). Otro estudio mostró que tras la exposición a agonista, una fracción significativa de los receptores internalizados se dirige a los lisosomas donde son degradados (*Martini y col., 2007*).

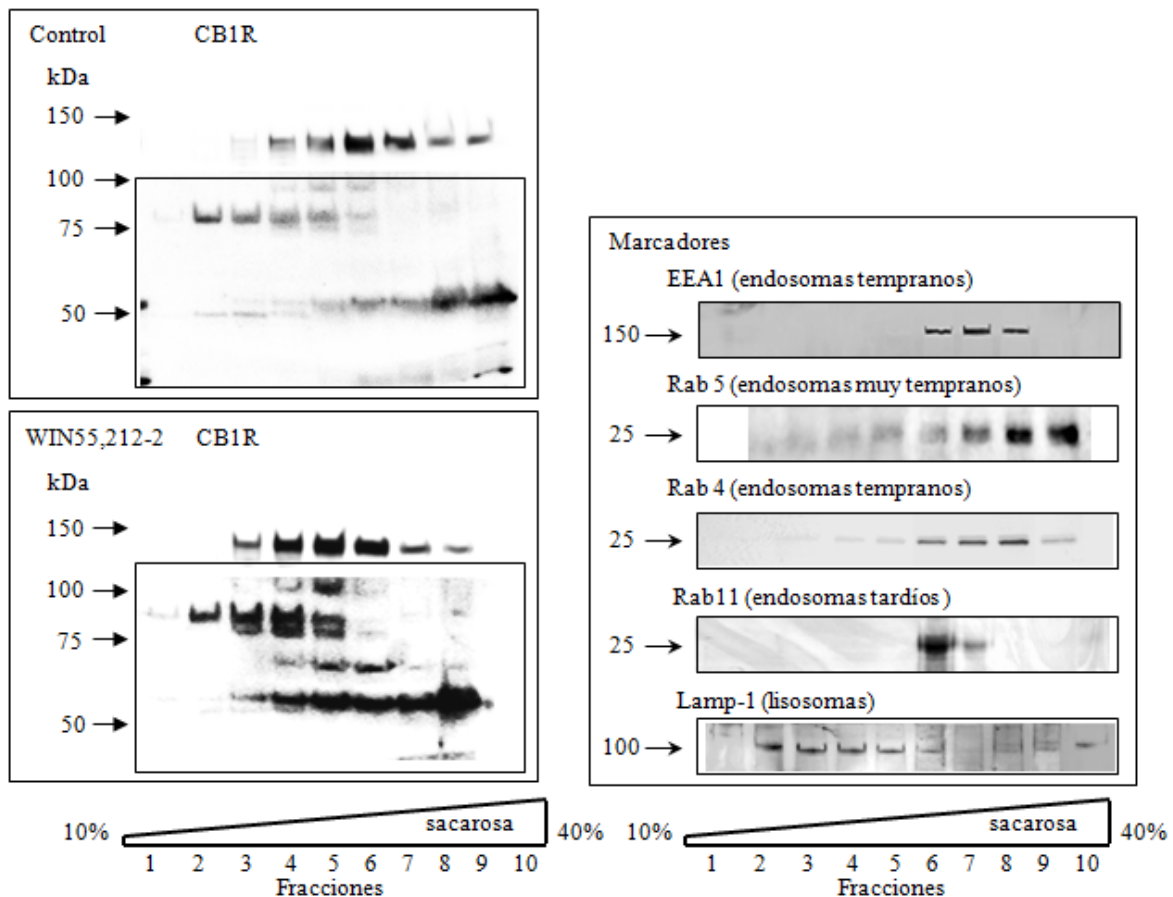


Figura 58. Subfraccionamiento celular de neuronas de PAG de ratón tras una dosis de WIN55,212-2. Los ratones recibieron una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2 y se sacrificaron a los 30 minutos de la inyección. La fracción citosólica se ultracentrifugó a 225.000xg durante 18 horas donde se separaron sus componentes en un gradiente continuo de 10-40 % de sacarosa. Las fracciones recogidas se concentraron y se separaron mediante SDS-PAGE. Los receptores presentes se detectaron con anticuerpos dirigidos al CB1R. Los anticuerpos correspondientes a los marcadores de orgánulos celulares son: EEA1 (endosomas tempranos), Rab 5 (endosomas muy tempranos), Rab 4 (endosomas tempranos), Rab 11 (endosomas tardíos), Lamp-1 (lisosomas).

Se separaron los componentes citosólicos para detectar la distribución del receptor CB1R que se encuentra en el interior celular. Se analizó la fracción S3 de animales control y animales que recibieron una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2. Se realizó el subfraccionamiento de esas muestras por centrifugación por gravedad en un gradiente de densidad (sacarosa del 10 al 40 %). Las

fracciones del gradiente de sacarosa que contienen las vesículas purificadas se analizaron mediante *Western Blot* (adaptado de *Doyle y col., 1986*) (Figura 58).

El subfraccionamiento celular de S3 de PAG de una muestra control, en ausencia de activación por agonistas exógenos, dio un marcaje del receptor internalizado. La banda correspondiente al peso teórico del CB1R aparecía en las fracciones correspondientes a endosomas tempranos o muy tempranos, fracciones 6 a la 10 (marcadores EEA1 y Rab5). No se encontró asociado a lisosomas, fracciones 2 a la 6 (marcadores Rab11 y Lamp1), lo que podría indicar que su procedencia sería de síntesis. Considerando las bandas superiores del CB1R que se obtuvieron con el marcaje del anticuerpo, asociadas a las formas glicosiladas del receptor, se relacionó la transición de endosomas tempranos a lisosomas con los niveles de glicosilación: las formas con azúcares parecen tener un recambio más rápido.

A los 30 minutos de la inyección icv de 20 nmol de WIN55,212-2 se observó un aumento en la internalización del CB1R. Todas las bandas que reconoce el anticuerpo dieron un marcaje más intenso. La banda que se corresponde con el peso teórico del receptor se detectó en los endosomas tempranos y de reciclamiento, fracciones 6 a la 8, y en los endosomas tardíos y lisosomas, fracciones 2 a la 6.

A pesar de la internalización del receptor CB1 observada tras la dosis aguda de los agonistas, los niveles volvieron a ser similares a los de la situación control a los dos días de la administración de los cannabinoides. Sin embargo, hasta varios días después los ratones siguieron mostrando tolerancia a dosis adicionales tanto de WIN55,212-2 y ACEA como de metanandamida. Por lo que la desensibilización observada no se debía a la retirada del receptor de la superficie.

5.4. Implicación de las subunidades $G\alpha$ en la señalización cannabinoide

Las consecuencias celulares de la activación del receptor CB1 incluyen entre otras la inhibición de la adenilato ciclasa, la activación de la cascada de las MAPK y la modulación de los canales de iones (*Pertwee, 1993; Demuth y Molleman, 2006*). Estos efectos están mediados por las diferentes proteínas G que están asociadas al receptor. Para determinar el tipo de subunidades $G\alpha$ que se encuentran en el entorno del CB1R, se solubilizaron membranas sinaptosomales de PAG de ratón, se inmunoprecipitó con IgG correspondientes al CB1R-Nt y mediante *Western blot* se detectaron las subunidades asociadas. En esta estructura se observó que el CB1R coprecipitó con las proteínas G sensibles a la toxina pertúsica $G\alpha_i$ y $G\alpha_o$, así como con las insensibles $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_z$ (Figura 59).

Tras la exposición al agonista la internalización se revierte con el rápido reciclaje de los receptores a la superficie celular pero no la tolerancia, analizamos si la maquinaria de señalización está implicada como ocurre para el MOR activado con morfina.

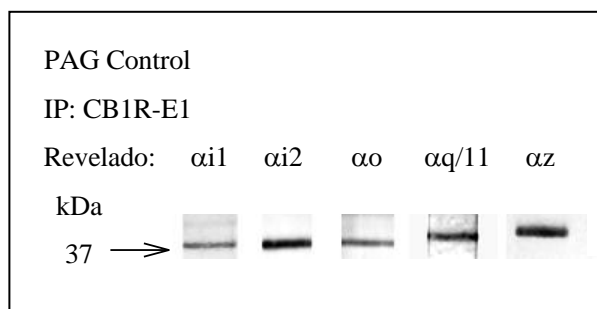


Figura 59. Asociación de las subunidades Gα con el CB1R en PAG de ratón. Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al CB1R-E1. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con los anticuerpos dirigidos frente a las subunidades G: αi1, αi2, αo, αq/11, αz.

5.4.1. Transferencia de proteínas Gα

Para la morfina se ha visto que produce una alta tolerancia sin pérdida del receptor de la superficie. En el cerebro, la mayoría de los casos de tolerancia a morfina se produce por una disminución de las proteínas G asociadas al receptor, que son transferidas de forma estable a RGS de las subfamilias R7 y RZ (Garzón y col., 2005c, 2005d; Rodríguez-Muñoz y col., 2007).

Se analizó la asociación del CB1R y de la RGS17 con las subunidades G tras la administración de una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2. Se solubilizaron los PAG de los animales tratados con el cannabinoide y que fueron sacrificados a diferentes intervalos tras la inyección. Mediante inmunoprecipitación se aisló al receptor y a la RGS y a las proteínas que vienen con ellos asociadas (Figura 60).

El agonista promovió el descenso del receptor de la membrana y la transferencia de las Gαi y Gαz del receptor a las proteínas RGSZ2, cuya presencia no se vio afectada por el tratamiento. Sin embargo, esta asociación fue transitoria, y cuando el receptor se recuperó en la membrana a las 24 horas tras la inyección, también se volvió a asociar a las proteínas G. Pasado ese tiempo los niveles son similares a la situación control.

En el caso de la morfina, la transferencia de Gα se mantiene en el tiempo disminuyendo la capacidad del MOR en respuesta a nuevos agonistas. Para el DAMGO, la transferencia observada también es temporal como ocurre con los cannabinoides. Aunque el DAMGO induce una fuerte internalización del receptor no produce una tolerancia muy marcada, a diferencia del WIN55,212-2, la ACEA o la metanandamida que indujeron una tolerancia muy significativa.

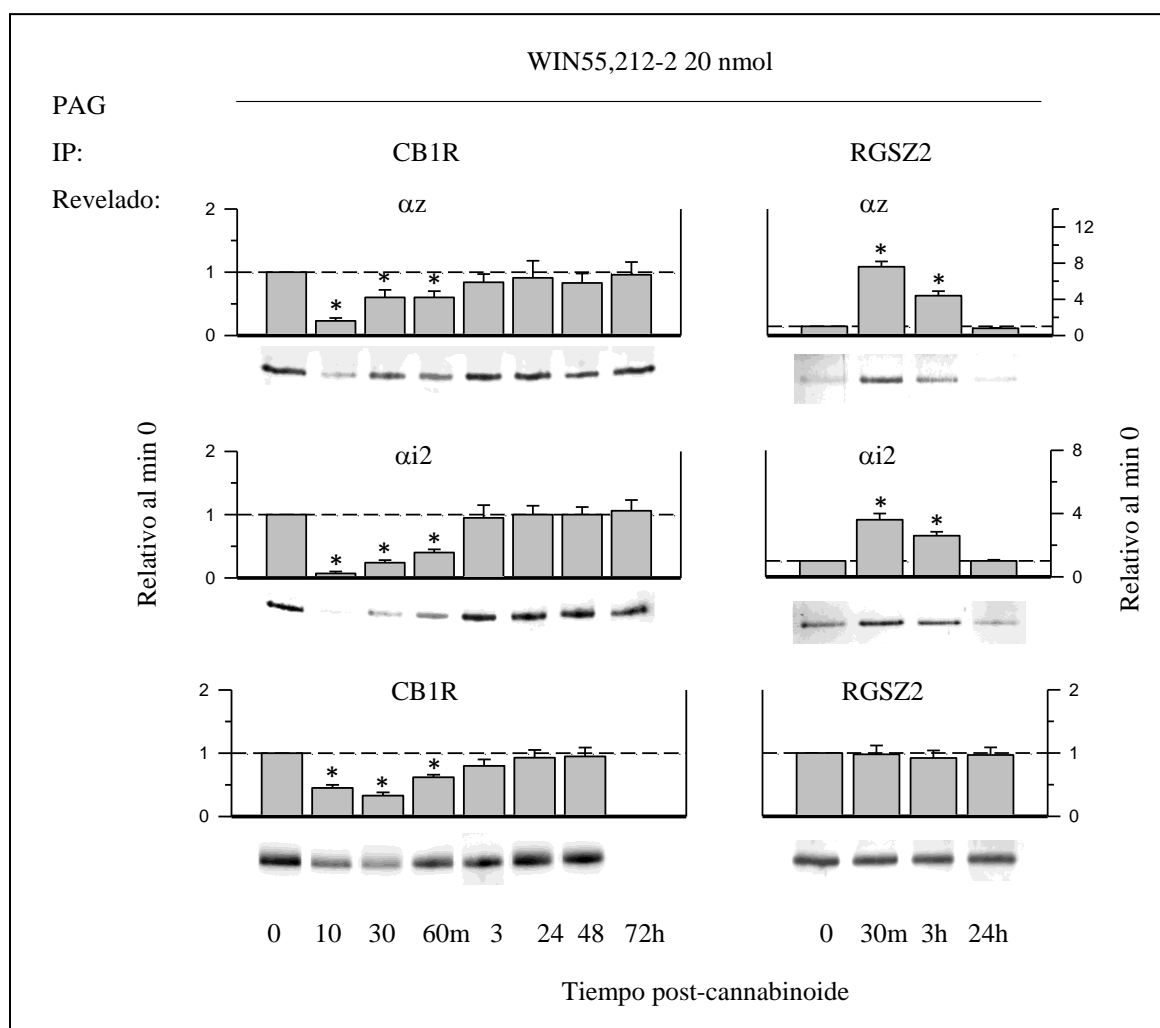


Figura 60. Co-precipitación de αz y $\alpha i2$ con CB1R y RGSZ2 en PAG de ratón tras activación con WIN. Los ratones recibieron una dosis de 20 nmol de WIN55,212-2 y se sacrificaron a los 10, 30, 60 minutos, 3, 24, 48 y 72 horas de la inyección. Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en tampón Nonidet NP-40 1 % y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a CB1R-E1 o frente a la RGS17. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a la $G\alpha z$, $G\alpha i2$, CB1R y RGSZ2. * Diferencias significativas respecto al grupo control ($P < 0.05$).

5.4.2. Reducción de la expresión de las subunidades $G\alpha$

Se ha visto que tras la activación el receptor CB1 las proteínas $G\alpha i2$ y $G\alpha z$ que están asociadas a él se separan y luego vuelven a reasociarse. Para determinar el papel de estas proteínas G en la desensibilización del CB1R medida por WIN55,212-2 se usaron ODN dirigidos frente a $G\alpha i2$ y $G\alpha z$ y se analizó la analgesia. Los animales recibieron un tratamiento subcrónico durante 5 días con los ODN y al sexto día se les administró una dosis aguda de 20 nmol de WIN55,212-2 y se analizó la analgesia a diferentes intervalos post-agonista (Figura 61).

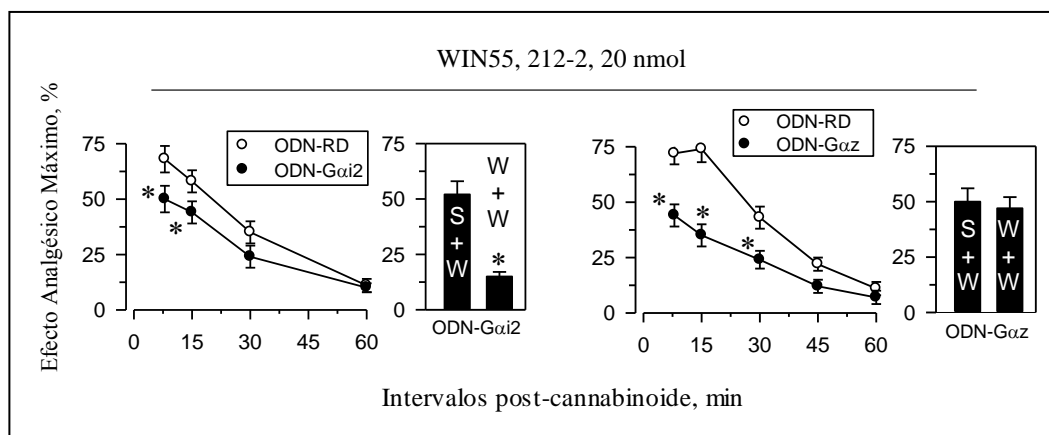


Figura 61. Efecto del *knockdown* de las proteínas G en la analgesia y tolerancia tras la administración de una dosis aguda de WIN55,212-2. Los ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODN $G\alpha i2$, ODN $G\alpha z$ y control (ODNRD). Al sexto día se les administró una dosis de 20 nmol de WIN55,212-2 20 y se determinó la analgesia 15, 30, 45 y 60 minutos después de la administración del agonista empleando el test de *tail-flick*. A las 24 horas de la primera administración se realizó otra similar del agonista WIN55,212-2 y se evaluó la analgesia. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Diferencias significativas entre el grupo control y los grupos que recibieron los ODN test ($P < 0.05$).

La reducción de la expresión de ambas proteínas G supuso un descenso significativo en la analgesia producida por 20 nmol/ratón de WIN55,212-2. Los cambios observados en el *knockdown* de la $G\alpha i2$ eran menos marcados que en los animales en los que la $G\alpha z$ estaba reducida. También se analizó la aparición de tolerancia mediante la administración de una dosis aguda de 20 nmol de WIN55,212-2 y luego otra similar a las 24 horas. El grupo de animales que recibieron el ODN $G\alpha i2$ desarrollaron tolerancia cuando se estudió la analgesia 24 horas después, el efecto analgésico del WIN55,212-2 estaba muy reducido. Sin embargo, cuando se usó el ODN $G\alpha z$, la respuesta al cannabinoide a una segunda dosis 24 horas después de la primera inyección fue similar, no apareció tolerancia.

Estas observaciones demostraron el papel relevante de esta subunidad $G\alpha z$ en la señalización mediada por WIN55,212-2, así como en el desarrollo de tolerancia que provoca. Se estudió el papel de esta proteína en la analgesia mediada por otros cannabinoides mediante la administración de 20 nmol de WIN55,212-2, 60 nmol de THC, 40 nmol de ACEA y 50 nmol de metanandamida en animales en los que estaba reducida la $G\alpha z$ mediante su ODN correspondiente (Figura 62).

En todos los casos, el efecto analgésico de los agonistas cannabinoides cuando esta subunidad G estaba reducida fue menor que en los animales control.

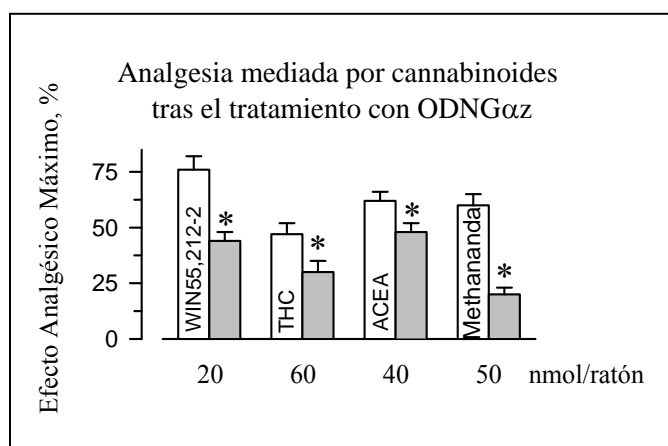


Figura 62. Efecto del ODNG α z en la analgesia y tolerancia tras la administración de una dosis aguda de WIN55,212-2. Los ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODNG α i2 o ODNG α z. Al sexto día se les administró una dosis de 20 nmol de WIN55,212-2, 60 nmol de THC, 40 nmol de ACEA o 50 nmol de metanandamida y se determinó la analgesia 10 minutos después de la administración del agonista empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Diferencias significativas entre el grupo control y los grupos que recibieron los ODN test ($P < 0.05$).

La proteína RGS9-2 es un regulador negativo de la actividad de la morfina, en su ausencia, el opioide tiene un mayor efecto analgésico e induce menos tolerancia (Garzón y col., 2001; Zachariou y col., 2003). Sin embargo, la ausencia de la RGS9-2 no afectó a la actividad del WIN55,212-2 o a su capacidad de producir la desensibilización del CB1R (Figura 63). La reducción de la expresión de la RGS2/RGS17 aumenta la señalización mediada por las Gz y promueve una rápida desensibilización de los MOR (Garzón y col., 2005c). Cuando la presencia de la RGS17 se disminuyó se observó una reducción del efecto analgésico de la dosis de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2 pero se siguió observando desensibilización al estudiar el efecto 24 horas después de la primera dosis (Figura 63).

Los agonistas cannabinoides parecen producir una desensibilización a largo plazo tras una dosis aguda al activar una vía de señalización donde las proteínas Gz juegan un papel esencial. La subunidad G α z es un miembro particularmente interesante de las proteínas Gi, como el resto de miembros de su familia inhibe ciertos tipos de adenilato ciclasas y es sujeto de miristoilación y palmitoilación (Mumby y col., 1990; Wong y col., 1992; Linder y col., 1993). La distribución de esta proteína está restringida a cerebro, médula espinal, retina y plaquetas (Casey y col., 1990; Hinton y col., 1990). Se asocia a una gran variedad de receptores entre los que se encuentran el α 2-adrenérgico, el dopaminérgico D2, el muscarínico M2 o el MOR (Wong y col., 1992; Tsu y col., 1997; Garzón y col., 1997, 1998). Se ha visto que la subunidad G α z tiene un papel en la transducción de los efectos mediados por el receptor activado tras morfina. En animales que no poseen esta subunidad se ha observado un incremento en el desarrollo de tolerancia a morfina (Hendry y col., 2000; Leck y col.,

2004). Nuestros resultados indican que tanto para el sistema opioide como para el sistema cannabinoide que la *Gaz* tendría un papel clave en los efectos analgésicos, efectos secundarios como la tolerancia e incluso los efectos nocivos de estas sustancias.

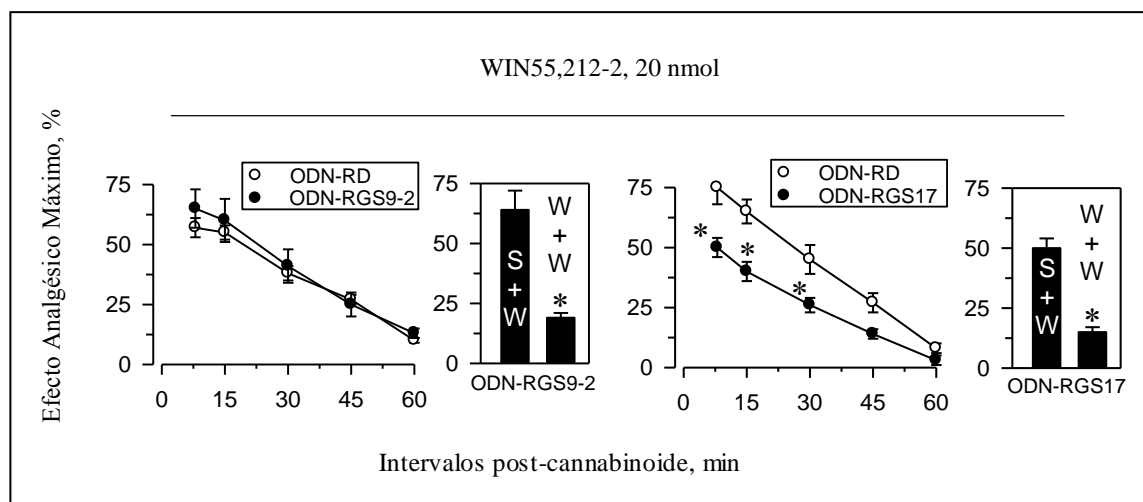


Figura 63. Efecto del *knockdown* de las proteínas RGS en la analgesia y tolerancia tras la administración de una dosis aguda de WIN55,212-2. Los ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODNRGS9-2, ODNRGS17 y control (ODNRD). Al sexto día se les administró una dosis de 20 nmol de WIN55,212-2 y se determinó la analgesia 15, 30, 45 y 60 minutos después de la administración del agonista empleando el test de *tail-flick*. A las 24 horas de la primera administración se realizó otra similar del agonista WIN55,212-2 y se evaluó la analgesia. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Diferencias significativas entre el grupo control y los grupos que recibieron los ODN test ($P < 0.05$).

5.5. Tolerancia cruzada entre CB1R y MOR

Los receptores CB1R y MOR presentan numerosas similitudes en sus mecanismos de señalización (Martin y col., 1994; Pertwee, 1997; Ríos y col., 2006). En nuestro sistema se analizó la tolerancia cruzada entre CB1R y MOR. Se administró una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2 y se estudió el efecto analgésico de una dosis de 10 nmol/ratón de Morfina y 1 nmol/ratón de DAMGO 24 horas después de haber recibido la administración de WIN55,212-2 (Figura 64.A). En el otro sentido, se administró una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2, 10 nmol/ratón de Morfina y 1 nmol/ratón de DAMGO y se estudió el efecto analgésico de una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2 24 horas después (Figura 64.B).

La analgesia mediada por morfina se vio afectada por una previa administración de WIN55,212-2 reduciendo los efectos hasta el 50 % de EAM. Sin embargo no se apreciaron diferencias entre las dosis de DAMGO cuando previamente se administró el vehículo o el WIN55,212-2, ambas respuestas

se corresponden con el máximo efecto observado para esta dosis del opioide (Figura 64.A). Las administraciones agudas de los opioides Morfina y DAMGO no produjeron reducciones en los efectos analgésicos del WIN55,212-2 cuando se administró 24 horas después de los opioides (Figura 64.B). Los resultados indicaron que la desensibilización aguda sólo aparecía en dirección del CB1R al MOR, es decir, que disminuye el efecto analgésico opioide cuando previamente se ha administrado WIN55,212-2.

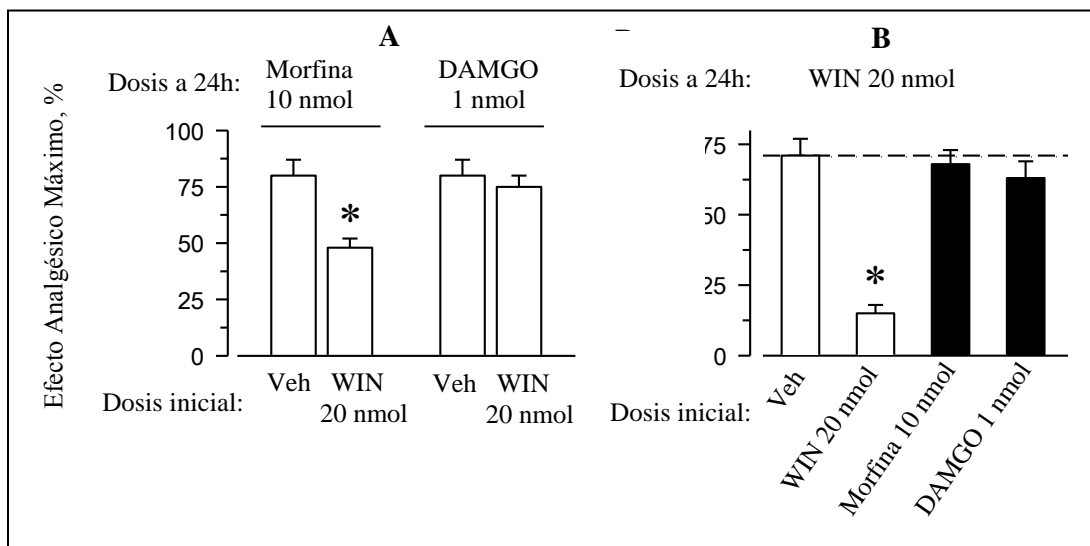


Figura 64. Tolerancia cruzada: efecto de una dosis de Morfina y DAMGO tras la administración de una dosis de WIN. **A.** Los animales recibieron una dosis inicial de vehículo (Veh) o de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2. Pasadas 24 horas, en uno de los grupos se administró una dosis de 10 nmol/ratón de Morfina y en otro 1 nmol/ratón de DAMGO. **B.** Los animales recibieron una dosis inicial de vehículo (Veh), 20 nmol/ratón de WIN55,212-2, 10 nmol/ratón de morfina y 1 nmol/ratón de DAMGO. Pasadas 24 horas, se administró una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2 a todos los grupos. Se determinó la analgesia 10 minutos después de la administración del agonista empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Diferencia significativa entre los valores relativos al Veh y a los agonistas ($P < 0.05$).

Los MOR regularían eficientemente la señalización mediada por las subunidades *Gαz*, promoviendo una débil desensibilización de los efectores dianas de las *Gαz*. Sin embargo, no afecta a la actividad analgésica mediada por el CB1R. La tolerancia producida por una dosis aguda de morfina se mantiene durante 3 ó 4 días, mientras que la producida por agonistas cannabinoides permanece más de 14 días. Se ha visto que la desregulación de las subunidades *Gαz* activadas por el receptor MOR cuando está disminuida la expresión de su GAP, la proteína RGSZ2, lleva a una profunda desensibilización de la analgesia producida por la morfina (Garzón y col., 2004; 2005c).

El módulo HINT1/RGSZ asociado al extremo carboxilo terminal del receptor MOR ayuda al receptor a controlar la activación de las proteínas *Gαz* (Guang y col., 2004; Ajit y col., 2007). La

ausencia de HINT1 disoció la proteína RGSZ2 de los MOR (Figura 48), reduciendo así la desactivación de las subunidades *Gαz* activadas por morfina. Se estudió el efecto analgésico de morfina y WIN55,212-2 en animales en los que se redujo la expresión de la proteína HINT1.

Los animales recibieron un tratamiento subcrónico durante 5 días con los ODNHINT1 y al sexto día se les administró una dosis aguda de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2 y 10 nmol/ratón de morfina se analizó la analgesia 10 minutos después de las administraciones. Tanto para el opioide como para el cannabinoide se observó un aumento del efecto analgésico respecto al control (Figura 65.A). En estos ratones, la morfina redujo la analgesia producida por el WIN55,212-2 (Figura 65.B).

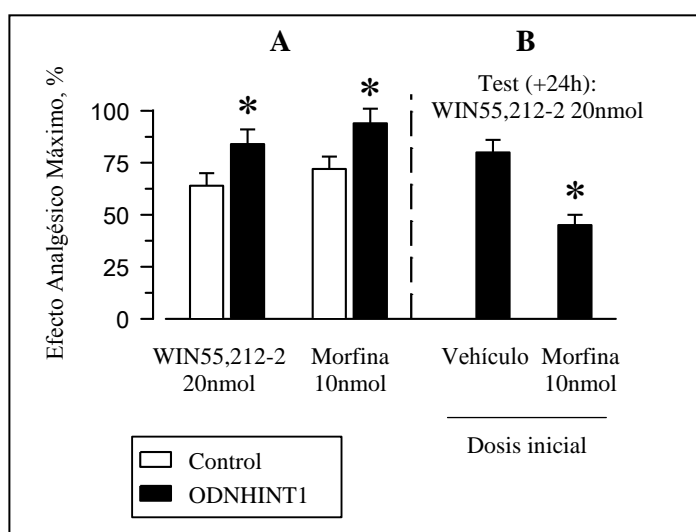


Figura 65. Tolerancia cruzada: efecto de una dosis de Morfina y DAMGO tras la administración de una dosis de WIN55,212-2. Los ratones recibieron una administración subcrónica (durante 5 días) con el ODNHINT1 y control (ODNRD). **A.** Al sexto día, a ambos grupos se les administró una dosis inicial de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2 o 10 nmol/ratón de morfina. **B.** Pasadas 24 horas, se administró una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2 a los dos grupos. Se determinó la analgesia 10 minutos después de la administración del agonista empleando el test de *tail-flick*. La antinocicepción se expresa como % EAM tras un tiempo de corte establecido de 10 segundos. Los valores corresponden a la media del % EAM de grupos de 10 a 15 ratones. * Diferencia significativa entre los valores relativos al ODN control ($P < 0.05$).

5.6. CB1R y el módulo HINT1/RGSZ

Puesto que la *Gαz* era importante para la señalización mediada por el CB1R y la proteína HINT1 aparecía implicada en estos procesos, se analizó si el receptor cannabinoide también aparece asociado al módulo HINT1/RGSZ permitiendo así un control sobre estas proteínas. Se solubilizó PAG control de ratón y se realizó la inmunoprecipitación de los receptores MOR y CB1R. Mediante *Western blot* se analizaron las proteínas del módulo que venían asociadas a ambos receptores (Figura 66).

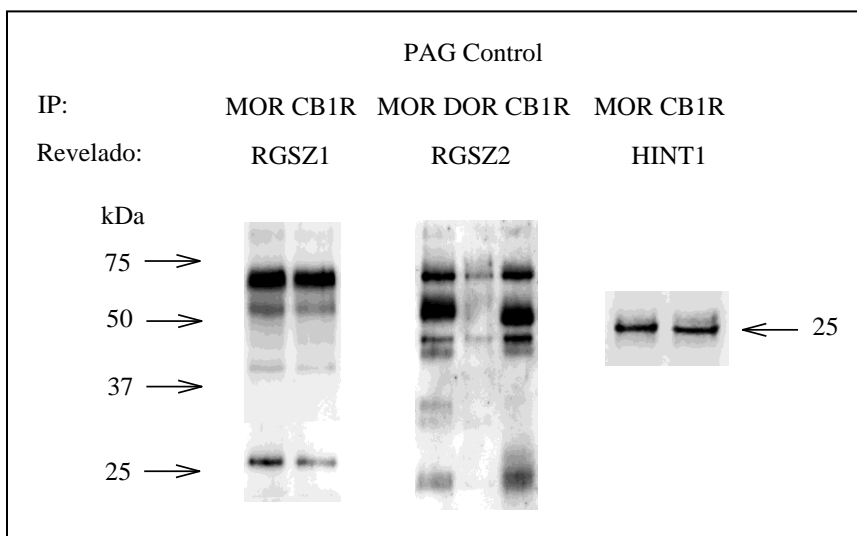


Figura 66. Asociación del módulo HINT1/RGSZ con MOR y CB1R en PAG de ratón. Membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente a MOR, CB1R y DOR. Los complejos proteicos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a la HINT1, la RGSZ1 y la RGSZ2.

Se observó que la proteína HINT1 coprecipitó con ambos receptores, así como las proteínas RGSZ1 y RGSZ2 que mostraron el perfil clásico de bandas en escalera de proteínas que aparecen glicosiladas y sumoiladas (Rodríguez-Muñoz y col., 2007). Este módulo no se asocia a todos los GPCR, el DOR, receptor opioide que no regula las proteínas G α z en cerebro (Sánchez-Blázquez y col., 1995) no aparece asociado a las RGSZ.

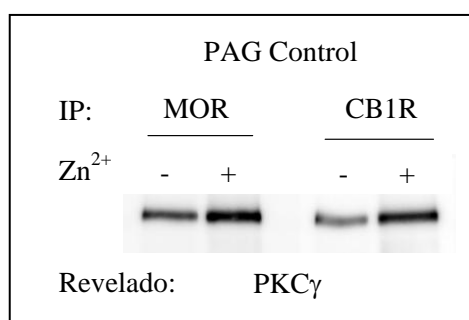


Figura 67. Efecto del aporte de Zn²⁺ en el reclutamiento de la PKC en el entorno del MOR y CB1R en PAG de ratón. Membranas sinaptosomales de corteza se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se incubaron con 30 nM de ZnCl₂ durante 4 horas a 4°C. Se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al MOR-E2 y al CB1R-E1. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con un anticuerpo específico frente a la quinasa PKC γ .

Este complejo también se ha visto implicado en el reclutamiento de la PKC γ al entorno del receptor MOR como respuesta a la activación receptorial que supondría una liberación de iones de Zn²⁺ libres al medio intracelular. Se realizó un ensayo en el que se incubaron membranas sinaptosomales de PAG de ratón con 30 nM de ZnCl₂ durante 4 horas a 4°C. Al igual que se describió para el MOR, cuando el CB1R tiene unido el complejo HINT1/RGSZ un aporte de Zn²⁺ incrementó la asociación del receptor con la PKC γ (Figura 67).

La administración de morfina promovió un aumento en la asociación de las PKC γ con el complejo MOR/HINT1/RGSZ, para probablemente fosforilar al receptor y desacoplarlo de las proteínas G, fosforilar directamente el NMDAR (*Tingley y col., 1993; 1997; Zukin y Bennett, 1995; Leonard y Hell, 1997*) o iniciar la señalización de la vía opioide a ERK (*Fukuda y col., 1996; Belcheva y col., 2000, 2001*).

Se analizó si de forma similar una dosis aguda de WIN55,212-2 influiría en la asociación de la quinasa con el receptor. Animales recibieron una dosis de 20 nmol/ratón de WIN55,212-2 y se estudió el receptor CB1R y su asociación con la PKC γ . Por *Western blot* se detectó que a pesar de que la presencia del receptor disminuye en la superficie celular, la asociación del CB1R con la quinasa aumentó en los primeros minutos desde la administración del cannabinoide volviendo a niveles similares a los basales pasados 60 min tras la inyección (Figura 68).

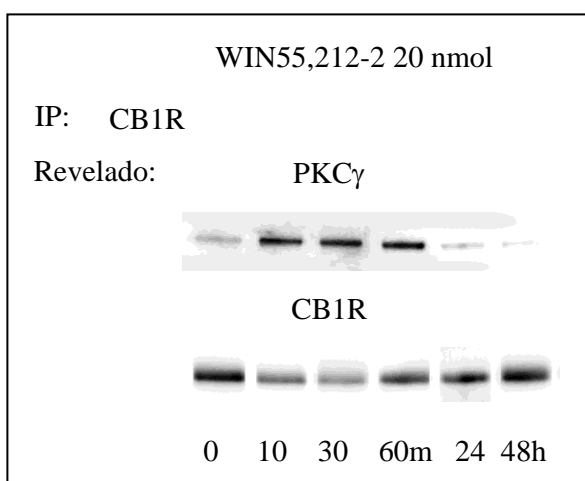


Figura 68. Asociación de la PKC γ con el CB1R tras la administración de WIN55,212-2. Los animales recibieron una dosis aguda de 20 nmol/ratón de WIN55, 212-2 y se sacrificaron a los 10, 30, 60 minutos, 24 y 48 horas. Las membranas sinaptosomales de PAG se solubilizaron en Tris-HCl/NaCl/Nonidet NP-40, se sonicaron y se realizó la precipitación con IgGs biotinadas dirigidas frente al CB1R. Los inmunocomplejos obtenidos, tras eliminar las IgGs, se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con anticuerpos específicos frente a la PKC γ y el CB1R.

Los resultados obtenidos mostraron que el sistema opioide está involucrado en la antinocicepción cannabinoide y también se ha visto involucrada la vía cannabinoide en los procesos mediados por los opioides. Estas interacciones se pueden explicar por la liberación de péptidos opioides promovida por cannabinoides, o la liberación de endocannabinoides por opioides, así como la interacción a nivel del receptor y/o sus mecanismos de transducción.

Discusión

Los opioides/opiáceos son, sin duda, los analgésicos más eficaces en clínica para el tratamiento del dolor. Sin embargo, la administración repetida de compuestos como morfina o heroína, producen una disminución progresiva de su potencia analgésica. Este desarrollo de tolerancia implica que serán necesarias cada vez mayores cantidades de los analgésicos para conseguir un mismo efecto, lo cual no sólo contribuye a la aparición de efectos secundarios indeseables (depresión respiratoria, alteraciones cognitivas,...), sino que incrementa la vulnerabilidad a los efectos adictivos asociados al consumo terapéutico o recreacional (abuso) de los opiáceos.

Los opioides tipo morfina producen sus efectos tras unirse al receptor opioide μ (MOR) que, como se mencionó previamente, pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G. El modelo clásico de tolerancia/desensibilización de los GPCR se ha asociado a la internalización y fosforilación del receptor por distintas quinasas y la unión a β -arrestinas (Arden y col., 1995; Zhang y col., 1996; Lefkowitz 1998). Sin embargo, considerando que la mayor parte del receptor μ internalizado no se destruye en el compartimento lisosomal sino que se recicla rápidamente a la membrana, la endocitosis del receptor se considera actualmente un proceso de resensibilización más que de desensibilización. Consecuentemente, agonistas como DAMGO, que promueven la internalización rápida del receptor, producen una escasa tolerancia a sus efectos. Más complejo es el proceso de desensibilización a la morfina en el cual intervienen múltiples proteínas de señalización, algunas de expresión prácticamente restringida al SN, implicando principalmente el desacoplamiento del receptor de su transducción.

En los últimos años la investigación de los mecanismos implicados en la tolerancia opioide ha avanzado de forma substancial. Los resultados de los grupos punteros en esta investigación han demostrado que en las neuronas actúan mecanismos específicos para controlar de forma eficaz la señalización de los receptores opioides, y así se ha logrado identificar un cierto número de las proteínas que son esenciales en esta regulación. El presente trabajo tiene tres grandes objetivos: profundizar en el conocimiento de estos mecanismos prestando especial atención a la regulación cruzada entre el receptor opioide μ y el NMDA; caracterizar el posible papel de la proteína RGS14 en esta regulación; y, finalmente, ofrecer una visión más general que nos permita aplicar estos hallazgos a otros sistemas receptoriales, concretamente al receptor cannabinoide CB1R.

1. Desarrollo de tolerancia: pérdida de función de los receptores opioides y cannabinoides

El trabajo de investigación del *Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Cajal* se ha centrado en el estudio del mecanismo de transducción asociado a los receptores opioides. Se ha puesto de manifiesto la relación entre la actividad intrínseca de los agonistas del MOR y los complejos constituidos por el receptor y las diferentes proteínas G que regula. La investigación ha demostrado que la pérdida de eficacia de ciertos agonistas está mediada por cambios en la maquinaria de

señalización asociada a los receptores. Las dosis agudas de agonistas capaces de generar tolerancia a corto-medio plazo producen una disminución temporal de las proteínas G susceptibles de regulación receptorial, a esto se debe el descenso de sus efectos agonistas (*Garzón y col., 2001a; Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001; Garzón y col., 2003*). El conjunto de estos trabajos ha demostrado que la potencia analgésica y los efectos adictivos de los opioides dependen tanto del correcto funcionamiento de sus receptores específicos, como del estado funcional de las proteínas G que tienen asociadas.

La desensibilización del receptor es dependiente del intervalo entre administraciones, y luego de producirse se precisa un periodo de aproximadamente 72 horas para recuperar la potencia analgésica del opioide. En nuestro estudio la administración de una dosis adecuada de morfina produjo una clara pérdida de analgesia ante una segunda administración. En el caso de DAMGO la pérdida de respuesta analgésica es muy discreta cuando el intervalo entre dosis es de 24 horas. Sin embargo, la administración de tres dosis consecutivas de DAMGO produjo un alto grado de tolerancia. Es obvio que el descenso progresivo del número de receptores reciclados tras cada administración es responsable de la desensibilización finalmente observada.

Con el fin de poder extrapolar los resultados obtenidos a otros GPCR, se ha incluido en el estudio al receptor cannabinoide tipo 1 (CB1R) que comparte con el sistema opioide los mecanismos de señalización y los agonistas de ambos receptores son eficaces analgésicos principalmente en cuadros de dolor en los que los opioides no son efectivos. En este sentido, la bibliografía recoge numerosos estudios en los que se describen que los cannabinoides median la antinocicepción supraespinal a través de la activación de los receptores CB1R (*Elmes y col., 2004; Hohmann y Suplita, 2006*). Se sabe que la administración repetida de WIN55,212-2 induce tolerancia, produciendo desensibilización y pérdida de receptores CB1 (*Sim-Selley, 2003; Tanda y Goldberg, 2003; Sim-Selley col., 2006*). Es de destacar que, en estas circunstancias, se requiere más de dos semanas para recuperar los niveles iniciales del receptor así como la respuesta analgésica a agonistas (*Oviedo y col., 1993; Sim-Selley y Martin, 2002; Sim-Selley y col., 2006; Tappe-Theodor y col., 2007*). Nosotros hemos observado que una dosis aguda de cannabinoide administrada icv es suficiente para promover una desensibilización profunda y duradera de los receptores supraespinales.

1.1. Mecanismos de tolerancia que afectan al propio receptor: fosforilación e internalización del MOR

La internalización del receptor inducida por agonista supone una disminución del número de sitios potenciales para su unión y este fenómeno se asocia al desarrollo de tolerancia (*Hu y col., 2002*). La fosforilación del receptor por diferentes quinasas representa el modelo clásico de desensibilización de los GPCR (*Marie y col., 2006; Wang y Wang, 2006*) y se considera el mecanismo principal en la atenuación de la señalización de estos receptores. En sistemas de células en cultivo se ha descrito la

fosforilación e internalización del receptor en respuesta a los agonistas (*Lefkowitz, 1998*). Aunque un cierto número de receptores internalizados se dirigen a los lisosomas, la mayor parte son reciclados a la membrana plasmática (*Tanowitz y von Zastrow, 2003*). Sin embargo, una estimulación continuada del sistema puede llevar a que una mayor proporción de los receptores se dirijan a los lisosomas. El balance entre la fracción de receptores internalizados que se dirigen a la degradación proteolítica en lisosomas y la fracción correspondiente a receptores de nueva síntesis va a determinar la respuesta a agonistas (*Trejo y col., 1998*).

En el caso concreto de los opioides en el sistema nervioso maduro, se ha observado en células en cultivo que estos mecanismos básicos muestran ciertas modificaciones en la regulación de los receptores μ . Como ya hemos mencionado, DAMGO promueve una fuerte fosforilación e internalización del receptor tanto en sistemas celulares como en el cerebro, acompañado de una ligera tolerancia (*Keith y col., 1998; Trafton y col., 2000; Walwyn y col., 2004*). Por el contrario, a diferencia de lo observado en cultivos celulares, en el sistema nervioso maduro la morfina no produce internalización del receptor opioide μ (*Sternini y col., 1996; Garzón y col., 2005b*), aunque sí aparece la desensibilización y la tolerancia (*Garzón y col., 2005b; Sánchez-Blázquez y col., 2005*).

En nuestro estudio la inyección icv de DAMGO produjo una rápida e intensa fosforilación en la Ser375 del receptor (vinculada a GRK) e internalización del receptor. Estos receptores reciclados de nuevo a la membrana resensibilizaron al sistema para responder a nuevas dosis. La exposición inicial a una dosis aguda de morfina de 10 nmol indujo un efecto analgésico con un pico máximo a los 30 minutos después de la inyección, que descendió a partir de ese momento de forma que a los 90 minutos ya no se detectó prácticamente analgesia. Esta dosis promovió una débil fosforilación en la posición Ser375 sin internalizar al receptor. Sin embargo, el anticuerpo antifosforinas 1C8 detectó un incremento y posterior bajada en la fosforilación. Esta fosforilación de los dominios citosólicos del MOR puede regular su acoplamiento a las vías de señalización sin que se produzca su internalización (*El Kouhen y col., 2001; Cerver y col., 2001, 2004*). No obstante, incluso en el SN una segunda dosis de morfina separada 6 horas de la primera produjo una intensa fosforilación así como la internalización/ reciclaje del MOR. La aplicación de dosis sucesivas de morfina o una administración crónica del agonista también provocaron la fosforilación e internalización de estos receptores opioides.

El análisis de la asociación entre el receptor opioide μ y la β -arrestina nos indica que en condiciones basales no están asociadas o lo están muy escasamente. Después de la administración de DAMGO, pero no de morfina, se observó un considerable incremento en esta asociación. Aunque las GRK y, probablemente, otras quinasas son capaces de fosforilar al receptor tras la morfina quizás lo hacen en residuos diferentes a los requeridos para que las β -arrestinas se unan y puedan promover su internalización. Estudios en cultivos celulares han permitido identificar sitios probables de fosforilación del receptor que participan en su desensibilización como tirosinas Tyr106 e Tyr166

(*McLaughlin y Chavkin, 2001*) ; serinas Ser261 y Ser266 para la CaMKII (*Briüggemann y col., 2000*); serinas y treoninas, como Thr180, Ser355, Thr357 y Ser375 para las quinasas de los GPCR, las GRKs (*Schmidt y col., 2000; Wang, 2000 Celver y col., 2001; Chavkin y col., 2001; Wang y col., 2002*). La secuencia 354-357 (TSST) del extremo carboxilo terminal del MOR es esencial para que opioides como el DAMGO promuevan la fosforilación de la Ser355 y Thr357 y así la internalización del receptor (*Wang y col., 2002*). También se ha visto la implicación en la desensibilización de los MOR de otras quinasas dependientes de segundos mensajeros como la PKC (*Ueda y col., 1995*) o las ERK (*Polakiewicz y col., 1998*). Finalmente, mencionar que la GRK2 puede ser fosforilada por PKC regulando la interacción con caveolina y calmodulina (*Winstel y col., 1996; Chuang y col., 1995; Eichmann y col., 2003; Ribas y col., 2007*) o por Src modulando su actividad sobre las Gαq (*Fan y col., 2001; Sarnago y col., 1999; Mariggio y col., 2006*).

Considerando que una parte de los receptores internalizados pueden dirigirse a diferentes compartimentos intracelulares para su degradación (*Hausdorff y col., 1990; Keith y col., 1998*), decidimos analizar mediante subfraccionamiento celular la ruta seguida por los MOR después de la administración del agonista. Tras una dosis aguda de DAMGO los receptores internalizados se detectaron en los endosomas tempranos y en los endosomas asociados al reciclaje. Después de cuatro dosis consecutivas de DAMGO, administradas a intervalos de 3 horas, los receptores se acumularon en las fracciones de los endosomas tardíos y los lisosomas para su destrucción. La degradación proteolítica del receptor en los lisosomas reduce el número de receptores en superficie, disminuyendo la respuesta (*Trejo y col., 1998*). Los resultados indican que los agonistas tipo DAMGO promueven la desaparición de los receptores de la superficie antes de que pueda restablecerse el sistema mediante síntesis *de novo* (*Cox y col., 1968; Bilsky y col., 1996; Kissin y col., 1991*), en este sentido hay que tener en consideración que en el caso del receptor opioide neural, su recambio es un proceso que requiere varios días (*Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989; Garzón y col., 2002*).

La administración icv de 40 nmol de ACEA o 30 nmol de WIN55,212-2 supuso una reducción del receptor en la membrana sinaptosomal del 60-70 % durante el tiempo que estos agonistas producían analgesia. Con el WIN55,212-2 se observó un aumento de la presencia del receptor CB1R en las fracciones correspondientes a los endosomas tempranos y tardíos y en los lisosomas. Estos resultados coinciden con estudios previos en sistemas celulares describiendo que la mayoría de los CB1R internalizados siguen una vía de degradación proteolítica en los lisosomas (*Martini y col., 2007; Tappe-Theodor y col., 2007*). Pasadas 24 o 48 horas, se recuperaron los niveles iniciales de receptores CB1, probablemente debido al reciclaje de una porción de los receptores internalizados y a la inserción de receptores sintetizados *de novo*. Sin embargo, no se recuperó la respuesta analgésica hasta pasados 14 días. Esta tolerancia tan marcada se observó incluso en agonistas como la metanandamida que no promovió la internalización del receptor. Por tanto, podemos concluir que la tolerancia observada tras una única dosis aguda de cannabinoide no se debe a la reducción del CB1R en la superficie celular.

1.2. Mecanismos de tolerancia que implican a la transducción: desacoplamiento de subunidades $G\alpha$

Dado que las neuronas son células altamente especializadas es posible que hayan desarrollado sistemas complejos a la hora de regular la función de los GPCR. Así por ejemplo, sabemos que la expresión de ciertas proteínas de señalización como ciertas RGS o subunidades $G\alpha_z$ está restringida al SNC (Casey y col., 1990; Hinton y col., 1990; Piñeyro y Archer-Lahlo, 2007) y que están participando en esta tarea. Estudios previos en el *Laboratorio* han puesto de manifiesto que en el tejido nervioso, la tolerancia a una dosis aguda de morfina está relacionada con la transferencia temporal de subunidades $G\alpha$ a ciertas RGS (Garzón y col., 2005b). Este fenómeno está mediado por proteínas de las subfamilias RGS-R7 y RGS-RZ, siendo la RGS9 y la RGSZ2 las más relevantes (Garzón y col., 2001; Rodríguez-Muñoz y col., 2007). Modificaciones post-traduccionales de estas proteínas les permitirían unirse a las subunidades $G\alpha$ activas y tras su desactivación estabilizarían su unión. La fosforilación de serinas del dominio RGS de las RGS-R7 y la unión de las proteínas 14-3-3 a esos residuos o la sumoilación de secuencias específicas de los RGS de las proteínas RGS-RZ parecen tener bastante relevancia en este proceso de retención de las $G\alpha$ (Garzón y col., 2005; Rodríguez-Muñoz y col., 2007). Una consecuencia de esta transferencia es la menor reconstitución del heterotrímero con acumulación de dímeros $G\beta\gamma$ libres en el entorno del receptor posibilitando el acceso de las GRK. Así en esta situación, otra dosis de morfina provoca la fosforilación de los MOR activos por esta quinasa. La influencia de estos eventos depende no sólo de la magnitud del efecto producido por la morfina sino también del intervalo de tiempo transcurrido entre las dosis del opioide (Garzón y col., 2005b).

En este estudio hemos confirmado que la administración de una dosis aguda (10 nmol) de morfina promueve la transferencia de subunidades $G\alpha$ a las proteínas RGSZ2, que se mantiene por más de 24 horas. En el caso del DAMGO se revierte rápidamente la transferencia de subunidades $G\alpha$ del receptor a las proteínas RGSZ2, lo que explica la escasa desensibilización observada tras la administración de una segunda dosis 24 horas después de la primera, momento en el que el receptor ya ha recuperado los niveles originales de las proteínas G reguladas. Es decir, la resensibilización opioide no sólo requiere el reciclaje de los receptores internalizados sino que estos receptores, al volver a la membrana, recuperen el control sobre las proteínas G.

Los experimentos realizados sobre animales *knockdown* para diferentes tipos de proteínas G indican que el CB1R en cerebro media la producción de analgesia a través de la activación de G_i/o , G_z . Nuestros resultados concuerdan y complementan lo obtenido en estudios previos realizados por Raffa y col., 1999. La reducción de las subunidades $G\alpha_i2$ no modificó el desarrollo de la tolerancia aguda, que sí se bloqueó en los animales tratados con el ODN para reducir la expresión de la $G\alpha_z$. A nivel molecular hemos observado una co-precipitación del receptor cannabinoide con diferentes $G\alpha$: $G\alpha_i1$, $G\alpha_i2$, $G\alpha_o$, $G\alpha_q/11$, $G\alpha_z$. De forma similar a los obtenido con el receptor opioide mu tras la

activación del receptor por el agonista WIN55122-2, se observó una disminución en la asociación entre el receptor CB1 y las proteínas G y una transferencia de $G\alpha$ a la proteína RGSZ2. Los niveles iniciales de asociación se recuperaron a las 24 horas post-cannabinoide.

2. Implicación de la RGS14 en la señalización mediada por los MOR

En una primera fase procedimos a determinar el nivel de expresión de las proteínas de la familia R12. Mediante el empleo de PCR cuantitativa hemos detectado la presencia de los tres miembros de esta familia en diferentes estructuras cerebrales del ratón. En general el ARNm de la RGS14 fue el menos abundante. En concreto, en el PAG los niveles de expresión del ARNm de la RGS14 eran muy reducidos, sin embargo sí se pudo detectar la proteína. Considerando que el PAG integra vías de diverso origen, como el hipotálamo, áreas cerebrales implicadas en funciones sensoriales (regiones parietales), emocionales-motivacionales (corteza insular, amígdala) y de atención (regiones prefrontales) (*Bandler y Shipley, 1994*), es posible que parte de los niveles provengan de proyecciones neuronales originadas en otras estructuras.

La RGS14 se encuentra asociada al receptor opioide μ y al CB1R. Es una proteína multifuncional de 61 kDa formada por el dominio RGS, dos dominios RBD y un motivo GoLoco lo que le permitiría actuar como *scaffold* en la señalización GPCR-MAPK. Es abundante en la región de la membrana celular (*Traver y col., 2000*), pero también actúa como una proteína esencial para la primera mitosis en el cigoto y para la proliferación celular normal de células en cultivo (*Mittal y Linder, 2006*). Tras la activación del receptor por la morfina, la RGS14 permanece asociada al MOR. Por el contrario, la administración de DAMGO disminuyó la asociación observada entre el receptor μ y la RGS14 ya que el receptor estuvo internalizado. En animales en los que la expresión de la RGS14 se disminuyó mediante el bloqueo de su ARNm los efectos analgésicos de la morfina aumentaron considerablemente, mientras que los del DAMGO no cambiaron de forma significativa. Esto se debe a que en animales con una menor expresión de la RGS14, la morfina produce una mayor fosforilación de la Ser375 y la internalización/reciclaje del receptor lo que se asocia a una menor tolerancia a la morfina, mientras que no afecta al DAMGO. Coincidiendo con el cese del efecto analgésico de morfina los niveles de receptor se recuperaron en la membrana. La asociación de la GRK2/3 y la β -arrestina con el MOR descendió con la internalización y volvió a aumentar con el reciclaje del receptor. Todas estas observaciones parecen indicar que la RGS14 actuaría limitando el acceso de las GRK a ciertos residuos del receptor impidiendo su fosforilación e internalización.

La asociación del receptor con las GRK es por tanto la causa principal de la internalización del receptor en respuesta a los agonistas (*Penela y col., 1998; Whistler, 1998; Schulz y col., 2004*). Este mecanismo podría ser el responsable de la tolerancia a los efectos del DAMGO observados tanto en los ratones *naïve* como en los animales *knockdown* para la RGS14. En el caso de la morfina, hay claras

diferencias ya que la reducción de los niveles de RGS14 provoca la internalización y el reciclaje del receptor opioide μ . Lo cual explica el mayor efecto analgésico y la reducción de la tolerancia a una única dosis observado en estos animales. No obstante se produjo una potente desensibilización del receptor al administrar dosis repetidas de ambos opioides. En este punto hemos de recordar que este protocolo reduce el reciclaje de los receptores internalizados a la membrana plasmática y así no se logra resensibilizar la respuesta a sucesivas administraciones de los agonistas (*Ferguson y col., 1998; Lefkowitz y col., 1998*). Así podemos concluir que la administración repetida de opioides disminuye los receptores en membrana antes de que con la síntesis *de novo* se puedan restablecer los niveles basales.

2.1. Activación de la cascada de las MAPK por morfina: papel de la RGS14

La vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) es una cascada de señalización que juega un papel crucial en numerosos procesos de regulación celular. La activación de esta ruta como respuesta a la estimulación con agonistas opioides puede formar parte de los mecanismos que llevan a la desensibilización de los receptores opioides tipo μ (*Polakiewicz, 1998*). Esta cascada consiste en la activación de proteínas de la familia del Ras que promueven la activación de Raf. La quinasa Raf activa mediante fosforilación a las proteínas serina/treonina quinasas MEK y éstas, a su vez, a las MAPK. Al tiempo que se ha relacionado la actividad de Ras con la activación de las ERK, en varios estudios se vincula la actividad de Rap con la p38 (*Sawada y col., 2001; Zhu y col., 2002*). Entre las distintas isoformas de Rap los miembros de la subfamilia Rap1, Rap1A y Rap1B, presentan un 95 % de homología de secuencia (*Paganini y col., 2006*). Mediante la generación de animales *knockout* se ha visto que estos Rap1 poseen funciones biológicas redundantes pero también otras únicas. Así, el Rap1A participa en adhesión celular, migración y fagocitosis de leucocitos (*Li y col., 2007*). El Rap1B está implicado en la hemostasis y la función de las plaquetas (*Chrzanowska-Wodnicka y col., 2005*). Los animales *knockout* para Rap1B muestran un porcentaje de letalidad del 85 % en las fases embrionaria y perinatal.

Otro de los objetivos del estudio se centró en el análisis de la activación de las diferentes proteínas de esta vía tras la administración de morfina. En PAG, pudimos observar cómo una dosis aguda de 10 nmol de morfina promovió la traslocación de las proteínas de la familia del Ras y de las MAPK a la membrana sinaptosomal reduciéndose su presencia en la fracción citosólica. También se observó un aumento de las formas activadas de Ras, Rap1A, Rap1B y Rap2 en la superficie celular como consecuencia de la administración del opioide. En nuestro estudio detectamos la presencia mayoritaria del Rap1A respecto del Rap1B en la fracción citosólica, mientras que en la fracción de membrana de corteza y PAG, es más abundante el Rap1B. Se han descrito niveles muy variables de Rap1A y Rap1B dependiendo de los tipos celulares (*Klinz y col., 1992*) aunque los niveles de expresión de ambos genes sean muy similares (*Culine y col., 1989*). Al reducir los niveles de

expresión de la RGS14 mediante el uso de ODN específicos se observó un incremento en la activación basal de Ras y Rap en la membrana. Los niveles de las ERK y la p38 también aumentaron. Sin embargo, en estos animales la administración de una dosis de 10 nmol de morfina no aumentó la activación de Ras o la presencia de las ERK, pero sí la activación de los Rap y la presencia de la p38. No se detectó un reclutamiento del C-Raf en el entorno del receptor cuando no estaba la RGS14, algo que sí ocurrió cuando se administró morfina en animales control.

Las proteínas *scaffold* (andamio) clásicas muestran interacción con múltiples componentes de la misma ruta de señalización y tienen como función facilitar su interacción al mantenerlas próximas al tiempo que les aporta una localización subcelular específica. Dada la variedad de dominios presentes en la RGS14, consideramos la posibilidad de que esta proteína actuase conectando la ruta de las MAPK con las vías de señalización de los receptores opioides mu. Al estudiar los cambios en las asociaciones de las pequeñas GTPasas y de las ERK con la RGS14, se vio un aumento de estas proteínas co-precipitadas con la RGS confirmando que la RGS14 establece un vínculo entre ambas vías ya que es capaz de interactuar con proteínas G a través del RGS y del GoLoco y también con miembros de la familia de los Ras a través de los RBD (*Kimple y col., 2002; Hepler y col., 2005*). Además, se ha descrito recientemente (*Shu y col., 2010*) que RGS14 también puede unir directamente a los Raf. Nuestros datos sugieren que la RGS14 tendría un papel en el control de las proteínas G monoméricas activadas o alternativamente y que podría ser esencial para que proteínas de la cascada como las ERK permanezcan en la fracción de membrana tras la activación del sistema. La falta de la RGS14 desregula este sistema favoreciendo la activación de unas rutas, disminuyendo la de otras y deslocalizando proteínas. Esto puede deberse a no poder actuar como proteína *scaffold* para los elementos de esta cascada.

Se han propuesto diferentes vías a través de las cuales los receptores GPCR pueden activar la cascada de la MAPK. Podemos asumir que el dímero G $\beta\gamma$ regulando PLC β promueve la liberación de DAG e IP $_3$ y, como consecuencia, el aumento de Ca $^{2+}$. La elevación del Ca $^{2+}$ intracelular lleva a una rápida y transitoria activación de la vía Raf/MEK/ERK (*Schmidt y col., 2000*). La unión de CaM al receptor opioide mu iniciaría la señalización de la vía de las ERK (*Belcheva y col., 2005*). Por otro lado, la activación de Rap1 por AMPc activa al B-Raf y estimula la cascada de MAPK (*Vossler y col., 1997*). Los mensajeros DAG y Ca $^{2+}$ activan a la PKC que fosforila al Raf en las serinas 497/499 potenciando su activación (*Barnard y col., 1998; Schonwasser y col., 1998*). Un componente presente en la mayoría de las rutas que llevan de los GPCR a las ERK/MAPK es la PKC (*Fukuda y col., 1996; Belcheva y col., 2000, 2001*). La PI3K también se activa por DAG y Ca $^{2+}$ y promueve la activación de Src. La quinasa Src recluta a Shc, GRB2 y Sos que actúan como GEF para el Ras iniciando la cascada de MAPK (*Alblas y col., 1993; Crespo y col., 1994; Koch y col., 1994; Stoyanov y col., 1995; Hawes y col., 1996; Lopez-Illasaca y col., 1997*). La unión de las subunidades Gaz/i a la Src modifica el estado de activación de la tirosina quinasa (*Rodríguez-Muñoz y col., 2008*). Src fosforila al C-Raf en

tirosinas que participan en su activación (*Fabian y col., 1993; Marais y col., 1995*). Por su parte, la subunidad Gao puede regular la actividad de B-Raf a través de un mecanismo dependiente de la PKC y de la PI3K (*Antonelli y col., 2000*).

3. Señalización MOR-NMDAR-MAPK

Recientemente se ha descrito que la cascada de las MAPK está regulada por el sistema glutamatérgico (*Wang y col., 2007*). El balance entre las proteínas G monoméricas activadas va a determinar la cascada de MAPK predominante en cada momento: ERK, p38 o JNK, que tendría como resultado la liberación de subunidades GluR1/R2L a la sinapsis, la retirada de GluR2/3 o la retirada de GluR1/R2L de la sinapsis respectivamente (Figura 69).

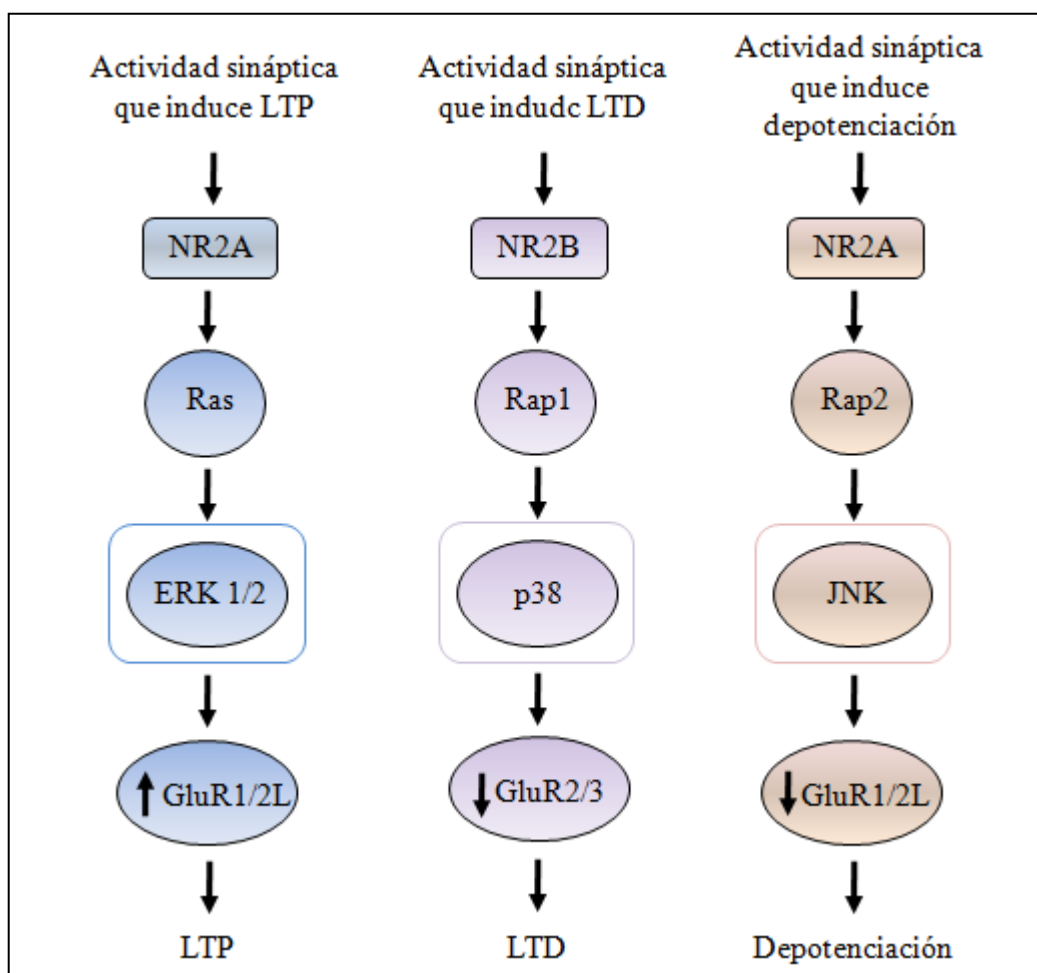


Figura 69. Modelo de plasticidad sináptica mediada por la ruta NMDAR-MAPK-AMPA. Ras activado por los NMDAR que contienen NR2A, mediante ERK 1/2, controla la liberación sináptica de GluR1 y GluR2L, durante LTP. Los NMDAR formados por NR2B activan Rap1 y mediante p38 controla la retirada de GluR2 y GluR3 durante LTD. La activación de los NMDAR con NR2A promueven la activación de Rap 2 que a través de JNK, controla la retirada sináptica de GluR1 y GluR2L durante la depotenciación. Adaptado de *Zhu y col., 2005*.

En este sentido, se ha visto que la activación de los canales NMDAR que contienen la subunidad NR2A promueve la activación de Ras y Rap2 (Zhu y col., 2002; 2005). Los NMDAR con la subunidad NR2B activan la cascada de Rap1 cuyo pico de activación es posterior al observado para Ras y Rap2, al menos el de Rap1B, que es la forma mayoritaria en la membrana (English y Sweatt, 1997; Bolshakov y col., 2000; Zhu y col., 2002, 2005). Ras interacciona con la Src a través del dominio catalítico de la Src, impidiendo su activación, lo que reduce la fosforilación de las NR2A y disminuyendo en la membrana sináptica el número de receptores NMDA que contienen estas subunidades (Thornton y col., 2003). La actividad del NMDAR también tiene como consecuencia que el NO generado por la NOS en un proceso dependiente de Ca^{2+} -CaM active directamente a Ras (Lander y col., 1996; Yun y col., 1998); estudios *in vitro* han mostrado que el NO podría activar también directamente a las proteínas G heterotriméricas (Lander y col., 1993).

En este contexto es interesante destacar que la administración de morfina originó un aumento de la presencia y la fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B del NMDAR en la membrana de PAG. En concreto, nuestros resultados muestran una primera fosforilación de NR2A que se corresponde con la activación minutos después de Ras y Rap2. Posteriormente, cuando ésta disminuyó, se observó el incremento de la forma fosforilada de la NR2B. Transcurridas 24 horas de la administración del opioide, los niveles de estas subunidades, así como de las formas fosforiladas, recuperaron los valores observados en situación control.

La fosforilación en tirosina de las NR2A y NR2B ocurre vía Fyn, Src y Pyk2 y tiene como resultado la potenciación de la actividad del canal. Esta fosforilación está modulada por mecanismos que incluyen a la PKC. La Pyk2 es una proteína tirosina quinasa dependiente de Ca^{2+} , rica en prolina, que parece ser clave en la vía de activación GPCR-ERK (Lev y col., 1995; Soltoff, 1998). Src participa en la activación de Pyk2 y ambas son requeridas en algunas células para la activación de ERK (Soltoff, 1998; Luttrell y col., 1999). El estado activado de la Src, como ya se ha mencionado, está regulado por las subunidades *Gaz/i* (Rodríguez-Muñoz y col., 2008). Finalmente, la defosforilación de los residuos del extremo carboxilo del NR2A por la calcineurina (Krupp y col., 2002) es la responsable de la depotenciación del NMDAR. La calpaína es una proteasa que se activa en respuesta a los aumentos del calcio intracelular como resultado de la actividad del NMDAR (Siman y col., 1983; Minger y col., 1998) y su actividad promueve la reestructuración de la PSD (Dosemeci y Reese, 1995). La PSD95 y los extremos carboxilo terminal de la NR2A y NR2B son sustrato de proteólisis mediada por calpaína (Lu y col., 2000; Guttmann y col., 2001). La fosforilación de la NR2A y NR2B por Src y Fyn tiene también un efecto protector en la degradación de estas subunidades por calpaína (Bi y col., 2000). Esta degradación, aunque no parece tener un efecto sobre las actividades funcionales básicas, podría tener una implicación sobre la localización, la internalización, la relación con segundos mensajeros o el reciclamiento del receptor (Guttmann y col., 2001). Las subunidades NR2 que han perdido ese

dominio pierden su capacidad de interacción con la PSD95 (Dong y col., 2004), lo que promueve la internalización del NMDAR (Roche y col., 2001; Kambe y col., 2010).

Tras la administración de una dosis aguda de morfina se observó que los niveles en membrana de la subunidad GluR1 se mantuvieron inicialmente constantes tras la inyección del opioide, a partir de las 3 horas aumentaron y permanecieron elevados al menos hasta las 24 horas. Las subunidades GluR2/3 disminuyeron su presencia en los primeros minutos y a partir de los 90 minutos se recuperaron, lo que implicaría que en un primer momento la vía predominante sería la de Rap1-p38 y a intervalos de tiempo más largos Ras-ERK.

Cuando se redujeron los niveles de RGS14 la administración de morfina invirtió el patrón de activación de las subunidades NR2. Así, la primera activada era la NR2B y luego la NR2A. Los niveles de los Rap1 y Rap2 activados aumentaron como respuesta de igual manera los niveles de p38 en membrana. No se observó activación de Ras ni de ERK con el agonista por lo que no se modificó la liberación de subunidades GluR1 y, consecuentemente, no se indujo el desarrollo de LTP. Además, en estos animales se observó la internalización del MOR y no se desarrolló tolerancia aguda. Tampoco se observó aumento en la fosforilación de la CaMKII, cuya activación se ha visto necesaria para la LTP (Revisado por Lisman y col., 1997). Por el contrario, los niveles de las subunidades GluR2/3 en membrana siguieron el mismo patrón que en los animales control disminuyendo en los primeros intervalos y luego recuperándose.

Finalmente, mencionar que una variedad de moléculas entre las que se encuentran la CaMKII, las proteínas de la familia de Ras, las ERK y p38, PI3K, participan en la regulación del tráfico de los AMPAR en la sinapsis dependiente de NMDAR (Zhu y col., 2002; Man y col., 2003). Hay dos moléculas dependientes de Ca^{2+} que conectan la vía de los NMDAR con las proteínas G monoméricas: el RasGRF1 y el SynGAP. El RasGRF1 es un GEF dependiente de Ca^{2+} /CaM, se expresa selectivamente en SNC y está enriquecido en la sinapsis (Sturani y col., 1997; Zippel y col., 1997) y es el responsable de la activación de las ERK dependiente de NR2B (Krapivinsky y col., 2003). El SynGAP es una proteína sináptica que contiene 10 histidinas que unen los iones Zn^{2+} y Ca^{2+} , y acelera la actividad GTPasa de Ras y Rap (Krapivinsky y col., 2004). Esta proteína es más eficiente cuando actúa sobre Rap y se ha visto asociada al receptor NMDA formando un complejo con la proteína scaffold MUPP1, la PSD-95 y la CaMKII (Kim y col., 1998; Komiyama y col., 2002; Oh y col., 2004; Pena y col., 2004). El SynGAP participa en la actividad y tráfico de receptores AMPA durante la actividad sináptica (Krapivinsky y col., 2004; Rama y col., 2008).

4. Señalización MOR-NMDAR/óxido nítrico

La actividad de los receptores de glutamato NMDA/óxido nítrico y la consiguiente activación de la CaMKII se ha visto que están implicadas en la desensibilización a morfina (*Trujillo y Akil, 1991; Pasternak y col., 1995; Bilsky y col., 1996; Mao y col., 1998; Fan y col., 1999; Lu y col., 2000; Inoue y col., 2003; Tang y col., 2006*). En consonancia con las diferencias entre morfina y DAMGO que hemos puesto de manifiesto, esta vía NMDA/NO no está involucrada en la tolerancia desarrollada tras la inyección de DAMGO (*Bilsky y col., 1996*). En nuestro estudio observamos que la administración de morfina causó una activación gradual de la CaMKII que se mantuvo a lo largo del tiempo (al menos hasta 3 horas tras la inyección del opioide), sin embargo, el DAMGO activó a la quinasa de forma puntual, observándose un incremento a los 15 min post-opioide. En animales a los que se redujo la expresión de la RGS14, la morfina produjo una baja activación de la CaMKII. Posiblemente, esto se produjo debido a la interrupción de esta vía a causa de la internalización del receptor.

Existen numerosas evidencias en la bibliografía que describen cómo la fosforilación de múltiples residuos en el extremo C-terminal citoplasmático de las subunidades NR1 y NR2 modula la actividad de los receptores de NMDA y afecta la transmisión sináptica. Estas fosforilaciones se encuentran reguladas por un amplio número de quinasas y fosfatasa entre las que se encuentra la PKC (*Xiong et al., 1998*). La activación de la PKC conduce a su translocación desde el citosol a la membrana plasmática (*Nishizuka, 1995*). En este sentido se ha propuesto que los opioides mu son capaces de producir una traslocación prolongada de PKC (*Narita y col., 1994*). De las 11 isoformas conocidas de PKC únicamente PKC α , PKC β y PKC γ estarían implicadas en la desensibilización de los receptores opioides mu (*Malmberg et al., 1997; Ventayol et al., 1997; Granados-Soto et al., 2000; Narita et al., 2001; Zeitz et al., 2001*). En concreto, la PKC γ parece jugar un papel especialmente relevante ya que se ha descrito su expresión exclusiva en neuronas de cerebro y médula espinal (*Saito y Shirai, 2002*). En animales que carecen de esta proteína se ha visto que la administración de morfina produce menos tolerancia (*Narita y col., 2001; Zeitz y col., 2001*). De acuerdo con estos datos, nuestro estudio revela que la administración de una dosis aguda de morfina promovió un aumento en la asociación de las PKC γ con el receptor MOR.

El dominio regulador de las PKC convencionales y noveles contiene un tándem de CRD, C1A y C1B, que le permite unir zinc y ésteres de forbol (*Ananthanarayanan y col., 2003*). La PKC γ a través del C1A une estas moléculas y mediante su C1B puede unir otras proteínas, entre ellas la 14-3-3 y la HINT1. Se ha descrito que la HINT1 se asocia al extremo carboxilo terminal del receptor mu formando dímeros (*Ajit y col., 2007*). En nuestro estudio se ha visto que la ausencia de la HINT1 no modificó la presencia de las PKC convencionales en membrana, sin embargo, se perdieron las asociaciones entre estas quinasas y el receptor MOR. Por otra parte, en animales en los que se redujo la expresión de HINT1, la administración de una dosis aguda de morfina originó un aumento de la

respuesta analgésica así como el desarrollo de una profunda tolerancia, sin detectarse una fosforilación dependiente de GRK en la Ser375 ni la internalización del receptor.

Un trabajo conjunto llevado a cabo por los grupos de *John Hepler* y *Kathleen Young* mostró que HINT1 era el nexo de unión entre el receptor opioide y las RGS-RZ (RGSZ1, RGSZ2) que hemos visto asociadas al MOR. Nuestros resultados evidencian que el módulo HINT1/RGSZ2 recluta PKC γ inactiva al receptor en respuesta a morfina y esta translocación requiere iones zinc libres. El ión Zn²⁺ requerido podría tener su origen en las metalotioneínas que liberasen el ión como respuesta al NO generado tras la activación de la nNOS y los receptores NMDAR. De hecho, esta idea se sustenta en que al añadir un donante de NO se promovió el reclutamiento de la PKC al receptor mu. Por último, la disociación de la quinasa del módulo HINT1-RGSZ2 tras su activación, podría fosforilar residuos de serina/treonina del receptor y desacoplarlo de las proteínas G.

La administración de calfofina, inhibidor de la PKC γ que interacciona específicamente con el CRD de la quinasa, impidió su asociación con el MOR. Por otra parte, el uso de quelantes de iones no disoció las RGSZ2 de la HINT1 lo que sugiere que la avidéz del módulo por el Zn²⁺ es mayor que la que poseen los quelantes estudiados, aunque sí que redujo la formación del complejo MOR/HINT1/RGSZ/PKC γ .

Finalmente, resaltar que nuestro estudio demuestra la asociación de CB1R con el módulo de señalización HINT1-RGSZ2, de forma similar a lo observado para el MOR. La presencia de este módulo asociado a ambos GPCRs les permite, además de reclutar PKC inactiva al entorno del receptor, la regulación de las subunidades *Gaz*-GTP activadas por agonista. Este hecho es de gran relevancia puesto que una desactivación ineficiente de *Gaz*-GTP provoca una sobre-regulación de los correspondientes efectores, lo que genera desacoplamiento de los GPCRs. Así, hemos observado que cuando el módulo de señalización deja de regular a las *Gaz* se desarrolla una profunda desensibilización tanto de los MORs como de los CB1Rs. Por el contrario, cuando se disminuye la expresión de la *Gaz* se reduce la desensibilización de varias dosis de morfina y del WIN55,212-2. Nuestros datos muestran que la inyección icv de cannabinoides produce la internalización de los CB1R y una transferencia reversible de las proteínas G a la RGSZ2 al igual que lo observado tras la administración de DAMGO. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el opioide, se observó una profunda tolerancia analgésica incluso después de que se recuperasen los niveles del receptor en la membrana y se re asociasen con las proteínas G. Estas diferencias podrían explicarse con las diferentes subunidades G activadas por los diferentes agonistas tras la unión a sus respectivos receptores. Los efectos analgésicos del WIN55,212-2 están mediados principalmente por las Gz mientras que el DAMGO requiere Gi/o y en menor proporción las Gz (*Garzón y col., 1997, 1998; Sánchez-Blázquez y Garzón, 1998; Sánchez-Blázquez y col., 2001*). Tras una sola inyección de morfina se necesitan al menos 3 días para recuperar la respuesta analgésica, para el caso de los cannabinoides estudiados este

tiempo es de más de 14 días. Estas observaciones indican que las proteínas Gz activadas por CB1R tienen un control menos eficiente que aquellas activadas por el MOR.

5. Resumen del trabajo

El trabajo de Tesis Doctoral ha permitido profundizar en la caracterización de una serie de proteínas neurales con función de señalización y en la regulación del receptor opioide mu, aunque algunas de ellas también ejercen este papel sobre otros receptores acoplados a proteínas G. Este trabajo, sin duda, contribuye a establecer los mecanismos de regulación en el SN y compararlos con los que se han descrito en base a la expresión de receptores en células no neurales en cultivo.

Concretamente, el trabajo realizado con RGS14 ha demostrado que su asociación con el receptor opioide mu limita la acción de quinasas como GRK y/o PKC sobre este receptor, interfiriendo con el proceso de endocitosis dependiente de β -arrestina (Figura 70).

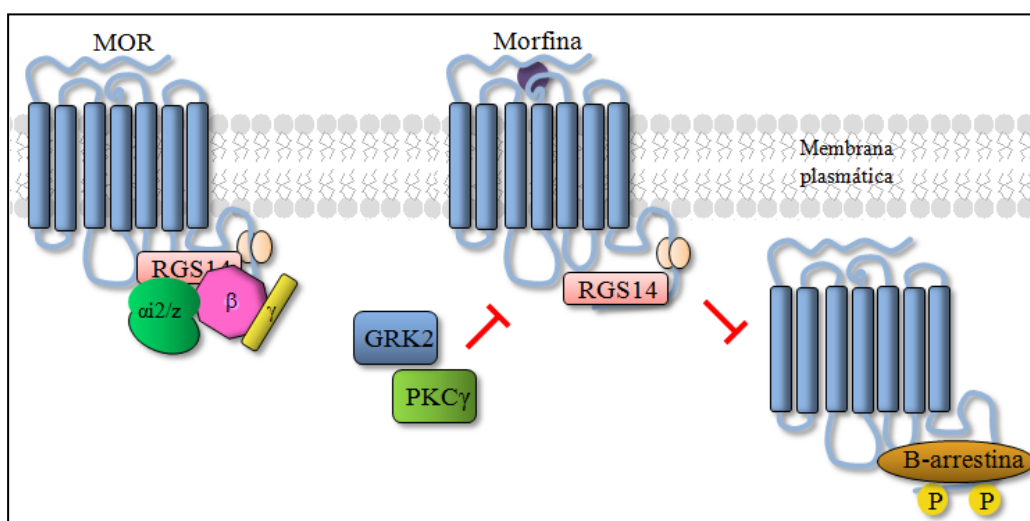


Figura 70. Papel de la RGS14 en la fosforilación e internalización del MOR tras la activación con morfina. Tras una administración aguda de morfina, la RGS14 asociada al receptor le protege de la fosforilación de residuos por las quinasas GRK2 y PKC γ y de la internalización mediada por β -arrestinas.

La asociación de la RGS14 con el receptor MOR impide que agonistas como morfina logren internalizar al receptor mu neural. La ausencia de esta proteína permite que ahora la morfina internalice al MOR y los opioides que ya lo hacían, como DAMGO, aumenten su efectividad. En estas circunstancias apenas se desarrolla tolerancia a la morfina ya que el receptor MOR se recicla a la superficie y se resensibiliza la respuesta al opioide. Asimismo, hemos podido determinar que en presencia de la RGS14 la desensibilización del receptor mu por morfina implica la activación de una quinasa (CaMKII) dependiente del receptor de NMDA. Esta CaMKII fosforila a la PhLPI

promoviendo la unión de las proteínas 14-3-3 reteniendo unido al dímero Gβγ (Sánchez-Blázquez y col., 2008), participa en el secuestro de la transducción del receptor opioide y conduce a la tolerancia.

Otro aspecto del estudio se ha centrado en la relación funcional entre el receptor opioide mu y la cascada de señalización de las MAPK, lo que nos ha llevado a analizar los aspectos moleculares que soportan esta comunicación. Los resultados obtenidos confirman que la estimulación del sistema opioide con morfina promueve la activación de las proteínas de la familia del Ras así como las rutas de MAPK con las que están relacionados. También se demuestra la importancia de la proteína RGS14 para el reclutamiento de las proteínas de los diferentes niveles de la cascada en la membrana celular y, más concretamente, en el entorno del receptor MOR, lo que contribuye a la regulación del efecto que estas vías de señalización tienen sobre el sistema glutamatérgico y el tráfico de receptores AMPAR (Figura 71).

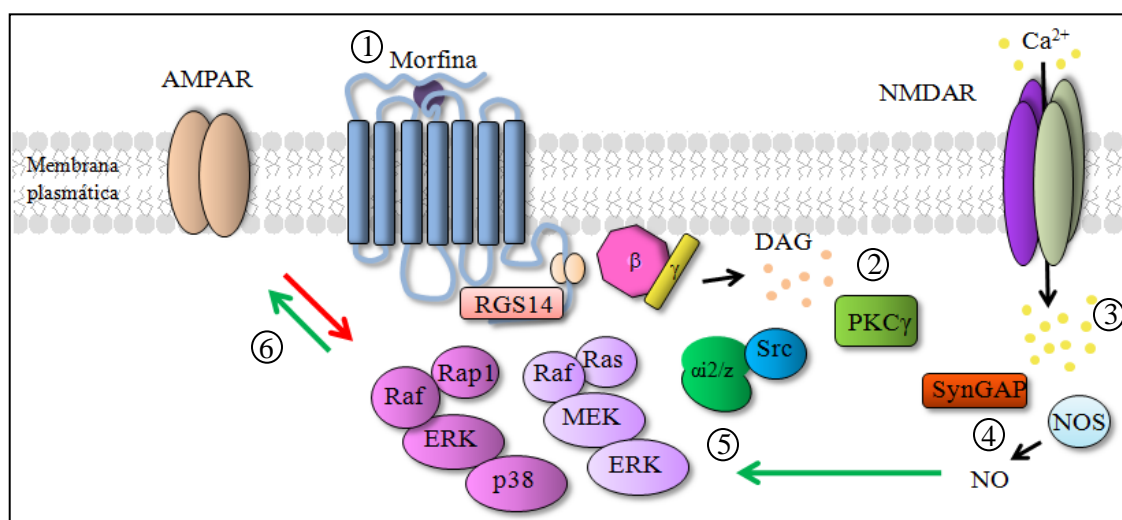


Figura 71. Cascada de señalización MOR/NMDAR/MAPK/AMPA. Modelo de secuencia de activación: la activación del MOR por morfina (1) promueve la potenciación de los NMDARs vía PKC y Src (2). El aumento de Ca²⁺ (3) facilita la formación de Ca²⁺-CaM que activa al SynGAP y la nNOS (4) que contribuyen a la activación de las MAPK y su reclutamiento en el entorno del MOR(5). El balance entre las distintas rutas de MAPK va a determinar el tráfico de subunidades del AMPAR (6).

Este trabajo ha contribuido a describir la existencia de un módulo de señalización compuesto por HINT1/RGSZ2 y su asociación con el MOR para modular sus efectos y prevenir la desensibilización del receptor. Nuestros datos indican que tras la administración de morfina se recluta PKCγ al entorno del receptor, induciendo la fosforilación de determinadas dianas como el NMDAR1 y la Src. Esto produce la activación de la vía NMDAR/CaMKII y, por tanto, se reduce la capacidad de señalizar del MOR. En animales *knockdown* para una de las proteínas del módulo HINT1/RGSZ2, no se observa la traslocación de la quinasa, lo que indica un papel como *scaffold* de la PKCγ. Por otra

parte, la activación de la vía NMDAR/*n*NOS proporciona iones Zn^{2+} esenciales para la unión de la PKC γ al módulo HINT1/RGSZ2 (Figura 72).

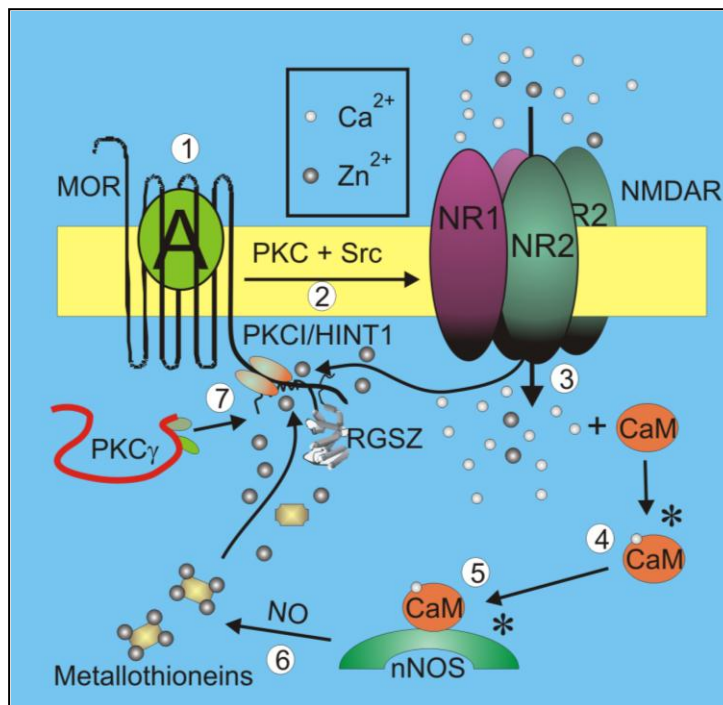


Figura 72. Modelo de reclutamiento de la PKC γ al receptor MOR gracias al módulo HINT1/RGSZ dependiente de Zn^{2+} . 1. La activación del MOR por morfina (A) promueve la potenciación de los NMDARs (2) vía PKC y Src. Src al fosforilar a las subunidades NR2 aumenta el flujo de iones Ca^{2+} y Zn^{2+} . (3). El Zn^{2+} podría ser el responsable del reclutamiento de la PKC γ (probablemente inactiva) al módulo HINT1/RGSZ del extremo Ct del MOR (7). El aumento de Ca^{2+} facilita la formación de Ca^{2+} -CaM (4) que activa la nNOS (5) produciendo NO. La acción del NO en los residuos de Cys de las metalotioneínas (6) libera los iones Zn^{2+} , lo que a su vez conduce a la formación del complejo HINT1/RGSZ/PKC γ (7).

Finalmente, y con el fin de establecer si este mecanismo de desensibilización podría ser utilizado por otros receptores G, hemos incluido en el estudio al receptor CB1. Hasta la fecha, casi la totalidad de los estudios sobre los mecanismos de desensibilización del receptor cannabinoide del tipo CB1 se han realizado administrando dosis repetidas de los agonistas por vía sistémica, este procedimiento tiene dos claros inconvenientes: por una parte no se puede diferenciar el tipo de receptor cannabinoide, CB1 o CB2, que media los efectos observados; por otro lado, y más importante, la administración sistémica no alcanza tanto ni tan rápidamente los lugares más supraespinales donde se sabe actúan los cannabinoideos que habitualmente se usan por vía inhalatoria. Los resultados obtenidos demuestran que en el SN ambos receptores, CB1 y opioide mu, regulan subunidades $G\alpha_z$, interactúan con el módulo HINT1-RGSZ2 y comparten los efectores localizados en esta vía de señalización. Nuestro trabajo describe por vez primera la vinculación entre el receptor CB1 y la subunidad α_z de las proteínas G, y la identifica como principal responsable de la persistente desensibilización del receptor CB1 en el cerebro.

Conclusiones

1. Los agonistas del receptor opioide mu como DAMGO y morfina difieren en su capacidad de promover la fosforilación del receptor por GRK2/3, su internalización dependiente de β -arrestinas así como su capacidad de inducir tolerancia a sus efectos. El DAMGO es un potente inductor de fosforilación/internalización del receptor opioide y sus efectos se modulan (reducen) mediante este mecanismo que es el que opera en la mayoría de receptores G en el sistema nervioso. Dado que una parte importante del MOR internalizado se defosforila y se recicla a la superficie, agonistas como DAMGO promueven un grado de tolerancia asumible. La morfina es un pobre inductor de fosforilación e internalización del MOR. Sin embargo, produce un elevado grado de tolerancia al modularse (reducirse) sus efectos mediante un proceso que conlleva la fosforilación del receptor en superficie y la transferencia de su transducción hacia ciertas proteínas RGS. El regreso de las subunidades $G\alpha$ al receptor requiere de su defosforilación por lo que durante este intervalo los efectos de morfina están claramente disminuidos (tolerancia).
2. La subfamilia de RGS-R12 se expresa en el sistema nervioso. Uno de sus miembros, la RGS14, se asocia directamente con el extremo carboxilo terminal del MOR impidiendo el acceso de las GRKs tras la activación con morfina pero no el DAMGO. Se sugiere que la mayor afinidad del DAMGO por el MOR permite que su unión permanezca tras la activación de la proteína G asociada al receptor y así se facilita la fosforilación por las GRKs de los residuos a los que se unirá la β -arrestina. La eliminación de la RGS14 permite un mejor acceso de las GRKs al receptor activado por morfina, ahora se internaliza/recicla y se observa un menor grado de tolerancia.
3. La proteína RGS14 actúa como proteína andamio para las proteínas de la cascada de las MAPK facilitando la formación de un complejo multiproteico de Ras-Rap/Raf/ERK y permitiendo su activación y retención en la membrana plasmática y en el entorno del receptor opioide mu después de la activación por agonistas del receptor.
4. La activación del receptor mu por la morfina aumenta el tráfico sinaptosomal de subunidades de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA y AMPA. La morfina potencia la función del NMDAR y de la CaMKII, efecto que se interrumpe al internalizar el receptor como es el caso del DAMGO o de la morfina en ausencia de RGS14. La potenciación dependiente del MOR de la vía NMDAR/CaMKII ejerce una retroalimentación negativa sobre los propios efectos del opioide y contribuye así a la tolerancia morfínica.
5. La vía NMDAR/NOS potenciada por morfina genera NO que libera iones zinc de las metalotioneínas. Estos iones facilitan la unión de PKC γ inactiva al módulo HINT1/RGSZ en el C terminal del MOR. El efecto de morfina sobre las PLC β vía dímeros G $\beta\gamma$ da lugar a DAG y calcio que promueven la activación de la PKC γ en el entorno del receptor mu. Esta quinasa activa a Src y ambas actúan sobre el NMDAR potenciando la permeación de calcio, formación de calcio-calmodulina y la activación-regulación de una gran variedad de proteínas de señalización, entre ellas la CaMKII.

6. El receptor cannabinoide comparte con el receptor opioide rutas de señalización. Los receptores CB1 al igual que los MOR interaccionan con el módulo HINT/RGSZ y ambos regulan las proteínas Gz. Las proteínas Gz específicas de neuronas son esenciales para mediar los efectos analgésicos supraespinales de agonistas cannabinoideos y de morfina. Estas proteínas G son responsables de la prolongada tolerancia producida por una única dosis de estos agonistas, así como de la tolerancia cruzada entre los CB1R y los MOR.

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Animales de experimentación.

En este estudio se emplearon ratones macho no consanguíneos, variedad albina, CD-1 (*Charles River. Laboratorios España, S.A., Barcelona, España*) con un peso de 22-25 gramos. La estabulación y utilización de los animales siguió la normativa vigente de la Unión Europea sobre uso y experimentación con animales de laboratorio (*Council Directive 86/609/EEC*). Los animales se mantuvieron a 22° C en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, la comida y la bebida se proporcionaron *ad libitum*.

1.2. Anticuerpos.

Se sintetizaron péptidos correspondientes a las secuencias de nuestras proteínas de interés (Tabla I) (*Sigma-Genosys Ltd, Cambridge, UK*). Se diseñaron para que no presentasen homología de aminoácidos consecutivos con otras secuencias de proteínas conocidas (*EMBL, GenBank, and SwissProt*). Los péptidos incluían una cisteína amino terminal que se conjugó con la proteína transportadora hemocianina usando maleimidocaproilo-N-hidroxisuccinimida.

Las IgGs se purificaron por cromatografía de afinidad usando el péptido acoplado a *NHS-activated sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Barcelona, España, 17-0906-01)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

| Proteína | Nº Acceso NCBI | Secuencia péptido | Localización (aa) |
|----------|----------------|-------------------|-------------------|
| MOR | AAB60673 | TKYRQGSID | 208-216 (E2) |
| MOR | AAB60673 | DSSTGPGNTSDCSDP | 2-16 (Nt) |
| MOR | AAB60673 | LENLEAETAPLP | 387-398 (Ct) |
| CB1R | NP_031752 | DFHVFHRKDSPN | 177-188(E1) |
| CB1R | NP_031752 | FRGSPFQEKMTAGD | 53-66 (Nt) |
| Gai2 | NP_032164 | EEQGMLPEDLS | 115-125 |
| Gao | NP_034438 | AVAHIQGQY | 299-308 |
| Gaz | NP_03441 | TGPAESKGEITPELL | 111-125 |
| RGS14 | NP_058038 | GRPLRKSFRREMTG | 236-250 |
| RGS17/Z2 | AAF05758 | NSQIYKAFVESTTS | 192-205 |

Tabla I. Secuencias de los péptidos usados para generar los anticuerpos de las proteínas de interés. E- bucle extracelular. Ct- carboxilo terminal. Nt- amino terminal

Por otra parte se usaron anticuerpos comerciales: anti-fosfo-MOR (Ser375) (*Cell-Signalling*, 3451); anti-G β 5 (*Chemicon ABI648*); anti- β -arrestina2 (*Calbiochem 178600*); anti-CaMKII (*BD Biosciences 611292*); anti-fosfo-CaMKII (Thr286) (*Cell-Signalling 3361*); anti-Rap1 (*sc-13652*), anti-Rap2 (*BD Biosciences 610215*); anti-Ras (*BD Biosciences 610001*); anti-B-Raf (*BD Biosciences 612374*); anti-pMEK1/2 (*Biosource 44-452*); anti-ERK1/2 (*BD Biosciences, 610123*); anti-pERK1/2 (*BD Biosciences 610358*); anti-PKC α (*BD Biosciences 610107*); anti-PKC β I (*Sigma-Aldrich P3078*); anti-PKC β II (*Sigma-Aldrich P3203*); anti-PKC γ (*BD Biosciences 611158* y *Abcam ab4145*); anti-PKC δ (*BD Biosciences 610397*); anti-PKC ϵ (*BD Biosciences 610085*); anti-PKC θ (*BD Biosciences 610089*); anti-PKC η (*BD Biosciences 610814*); anti-PKC λ (*BD Biosciences 610207*); anti-SUMO1 (*Cell-Signalling, 4972*); kit de detección de fosfoserinas (clón 1C8) (*Calbiochem 525282*); anti-actina (*Stressgen CSA-400*); anti-NMDAR2A (*Abcam ab14596*); anti-NMDAR2A-P (*p-Y1325, Abcam ab16646*); anti-NMDAR2B (*Abcam ab14400*); anti-NMDAR2A-P (*p-Y1472, Chemicon AB5403*); anti-AMPA1 (*Abcam ab31232*); anti-AMPA2 (*sc-7610*).

1.2. Drogas y fármacos.

- Agonistas opioides μ : morfina sulfato (*Merck, Darmstadt, Alemania*), [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina (*DAMGO, Tocris 1171*), se prepararon en tampón salino.
- Agonistas cannabinoides: Araquidonil-2-cloroetilamida (*ACEA, Tocris 1319*), WIN55,212-2 mesilato (*Tocris 1038*), Δ^9 -tetrahidrocannabinol (*THC, Pharm, Frankfurt, Alemania*) se disolvieron en 1:1:18 (v/v/v) de etanol: *cremophor EL* (*Sigma Chemical Co., Madrid*): suero fisiológico. (*R*)-(+)-Metanandamida en *Tocrisolve™ 100* (*Tocris 1782*).
- Inhibidores de PKC: Gö7874 (*Merck-Calbiochem, 265252*); chelitrina (*Merck-Calbiochem, 220285*); calfofina C (*Merck-Calbiochem, 208725*).
- Donantes de óxido nítrico: (S)-nitroso-N-acetilpenicilamina (*SNAP, Tocris 0598*); NOR-3 (*Merck-Calbiochem 489530*).
- Quelantes de iones metálicos: N,N,N',N'-tetrakis(2-piridimetil)etilendiamina (*TPEN, Fluka WA16827*); 1,10 fenantrolina (*Sigma-Aldrich 13,137-7*).
- PMA (*Calbiochem 524400*).

2. Métodos

2.1. Medida del efecto analgésico.

La respuesta de los animales al estímulo nociceptivo fue determinada por el test del *tail-flick* (test de la retirada de la cola) por el que se mide el tiempo (en segundos) que transcurre desde que se introduce más de dos tercios de la cola en una cubeta con agua termostaticada a 52° C hasta que el animal reacciona retirando la cola. Los resultados se expresan como un porcentaje del efecto

analgésico máximo (% EAM= $100 \times (\text{latencia del test} - \text{latencia basal}) / (\text{tiempo de corte} \{10 \text{ segundos}\} - \text{latencia del test})$). El tiempo de corte era 10 segundos para evitar el daño tisular del animal. El análisis estadístico de los resultados incluyó el análisis de la variancia (ANOVA) y el test de *Student-Newman-Keuls* (*SigmaStat, SPSS, Science Software, Erkrath, Germany*).

Las drogas analgésicas aumentan el tiempo transcurrido desde que se aplica el estímulo hasta la retirada de la cola del animal. Esta respuesta motora requiere un reflejo espinal controlado por el tallo cerebral (*Hoffmeister y Kronenerg, 1966*).

2.2. Tolerancia y dependencia.

2.2.1. Administración aguda en el ratón: tolerancia producida por una dosis icv en el ratón.

Para realizar las administraciones intracerebroventriculares (icv) se anestesió ligeramente a los animales con éter y posteriormente se aplicó la inyección con una jeringa Hamilton de 10 μl en el ventrículo lateral derecho en un punto que dista 2 mm hacia la zona caudal y 2 mm hacia la zona lateral de la bregma, a una profundidad de 3 mm (*Sánchez-Blázquez y col., 1995*). Todas las administraciones se realizaron en un volumen de 4 μl de solución que fue infundida a una velocidad de 1 μl cada 5 segundos. En general, los analgésicos producen tolerancia con dosis agudas al alcanzar el 80 % de EAM. El grupo control recibió en su lugar solución salina vía icv.

El desarrollo de tolerancia se evaluó a las 24 horas, cuando el efecto de la primera dosis del analgésico había cesado y la respuesta era la latencia basal. A este intervalo de 24 horas se administró una dosis idéntica a la primera. El grupo control no recibió la primera dosis. La tolerancia aguda se evalúa cuando el analgésico alcanza su pico de efecto. La medida del efecto analgésico se realizó mediante el test del *tail flick*. Para los estudios de análisis funcional de los cambios producidos, los animales fueron sacrificados a los intervalos deseados por decapitación y se extrajeron las estructuras cerebrales para su estudio.

2.2.2. Administración crónica de opioides: desarrollo de tolerancia y dependencia morfínica en el ratón.

La inducción de tolerancia y dependencia debida a la administración crónica de morfina se realizó mediante la implantación subcutánea de este opioide. Los ratones fueron implantados con 10 ml/kg peso corporal de una suspensión de 0,1 g/ml de morfina base en solución salina al 50 % (0,9 % de NaCl en agua destilada), 42,5 % aceite mineral (*Sigma M-8546*) y 7,5 % *mannide monooleate* (*Sigma M-8546*) (*Sánchez-Blázquez y col., 1997*). Como índice del desarrollo de tolerancia crónica a la morfina a distintos tiempos tras la implantación de la suspensión oleosa, se evaluó el grado de

respuesta analgésica del opioide a una dosis icv de 10 nmol/ratón (DE80) mediante el test del *tail flick*. Al grupo control se le implantó únicamente el vehículo oleoso (placebo) y sirvió para determinar la latencia basal a los tiempos antes señalados. A diferentes intervalos los animales fueron sacrificados por decapitación y se extrajeron las estructuras cerebrales para su estudio molecular.

2.3. Diseño y síntesis de oligodeoxinucleótidos antisentido empleados en este estudio.

La administración *in vivo* de oligodesoxinucleótidos antisentidos (ODNs) ha demostrado ser eficaz para reducir la expresión de proteínas neurales ya que en el interior celular interfieren en la transcripción o desestabilizan el ARN mensajero. Los ODNs han de ser estables *in vivo*, capaces de penetrar en las células neurales, deben ser retenidos por estas células, interactuar con sus dianas moleculares y no hacerlo de forma inespecífica con otras macromoléculas (Stein y Cheng, 1993).

Los ODNs utilizados en este estudio fueron sintetizados por *Sigma-Genosys (Ltd, Cambridge, UK)*. Las secuencias no mostraron homología con otras proteínas clonadas en esta especie (*Genebank database*). Se administraron de forma subcrónica en el ventrículo lateral (icv). Cada animal recibió una serie de inyecciones de ODNs siguiendo un protocolo de 5 días: 1 nmol en los días 1 y 2, 2 nmol en los días 3 y 4, 3 nmol en el día 5. Los estudios funcionales se comenzaron en el día 6. Los ratones fueron monitorizados para controlar su actividad vertical y horizontal cada 10 min (*Digiscan animal activity monitor system, Omnitech electronics, Columbus, OH, USA*). Sólo los ODNs que no alteraron la motricidad fueron seleccionados para el estudio (Tabla II).

| Proteína | Nº Acceso NCBI | Secuencia ODN | Localización ARNm(nt) |
|----------|----------------|---|-----------------------|
| RGS14 | NM_016758 | 5'-G*T*AGTGGCAGCTTG*T*A-3' | 431-446 |
| RGS17 | NM_019958 | 5'-C*C*GAAGA GTCTCCTC*T*T-3' | 281-297 |
| RGS9-2 | AF-125046 | 5'-C*T*CGAATCA GTTVG*C*T-3' | 1044-1059 |
| Gai2 | NM_008138 | 5'-G*T*GGTCA GCCCA GAGCC TCCGGATGACGCC*G*A -3' | 477-502 |
| Gaz | NM_010311 | 5'-T*G*TAATCTCACCC TTGC TCTCTGCTGGGCCA*G*T -3' | 734-766 |
| PKCI | NM_008248 | 5'- T*T*GAGCCTTGCAAT*C*T-3' | 11-27 |

Tabla II. Secuencias de los ODN empleados en la experimentación.

*. Indica la protección con el grupo fosforotioato.

2.4. Producción de proteínas recombinantes.

2.4.1. Proteínas recombinantes B-Raf(RBD)-GST y RalGDS(RBD)-GST.

Se ha observado la afinidad diferencial de las proteínas G monoméricas Ras y Rap en GTP o GDP por el dominio RBD de RalGDS y de B-Raf. La obtención de estos dominios recombinantes va a permitir usarlos como herramientas para el estudio de las proteínas en su estado activado (*Spaargaren y Bischoff, 1994; Herrmann y col., 1996; Franke y col., 1997*).

2.4.1.1. Clonaje del dominio RBD de las proteínas B-Raf y RalGDS.

Las regiones codificantes de los dominios RBD de ambas proteínas fueron amplificadas (*Platinum Pfx DNA polymerase, Invitrogen Life Technologies*) mediante PCR a partir de ADN complementario de cerebro de ratón, utilizando los primers:

- B-Raf: 5' ATTGGATCCCCAGTTTGCAGTCAAGAGTG 3'
5' GTGAATTCTGTTCTAGCAGCTGGCAGTCTCG 3', producto de 390 pb
- RalGDS: 5' ACGGATCCTCACTGCCACTCTACAACC 3'
5' CTGAATTCTTGACTTTAGCCCCCTTAG 3', producto de 330 pb

La amplificación por PCR se llevó a cabo durante 40 ciclos en *DNA Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania)* siguiendo el protocolo: un ciclo 1 min a 94° C; 40 ciclos 30 seg a 74° C, 30 seg a 58° C, 2 min a 72° C; una incubación final de 5 min a 72° C. Los fragmentos se insertaron en vectores pGEX-4T3 (*GE Healthcare Life Sciences*).

2.4.1.2. Obtención de las proteínas recombinantes.

Una colonia de bacterias BL21 (DE3) transformadas con el ADN recombinante se cultivó en medio líquido 2xYTA (extracto de levadura 10 g/l, triptona 16 g/l, NaCl 5 g/l, ampicilina 50 mg/l). Cuando el cultivo alcanzó una DO (densidad óptica)= 0,8 se indujo la expresión de la proteína de fusión con la adición de 0,1 mM de isopropilo-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG). Tras 4 horas de incubación a 37° C se centrifugaron las bacterias a 4000xg durante 20 minutos y se congelaron a -80° C. El precipitado de bacterias congelado se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150mM, EDTA 1 mM pH 8, Tritón 1 %, Tween 0,5 %, DTT 1 mM, PMSF 1mM, 2,5 mg lisozima en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (*Sigma P8340*). Se mantuvo 15 minutos en hielo, se añadió 0,375 g de *N-laurelyl-sarcosine* y se sonicó en dos ciclos de 20 segundos (*Vibra-cell, output 4, duty cycle 40%; Sonics&Materials Inc. Danbury, Connecticut, USA*). Se trató con DNAsa 10 µg/ml en MgCl₂ 5mM durante 30 minutos en hielo. Tras una centrifugación a 19000xg durante 20 minutos, las

proteínas de fusión recuperadas en el sobrenadante se purificaron por cromatografía de afinidad mediante columnas Glutathion Sepharosa 4B (*GE Healthcare Life Sciences*). Fueron eluidas en gradiente de 0 a 10 mM de glutatión reducido. Se analizaron las fracciones obtenidas mediante *western blot* y se procesaron aquellas en las que la proteína recombinante estaba enriquecida. Las proteínas recombinantes se acoplaron a través del GST a agarosa (*NHS-activated sepharose 4 Fast Flow, 17-0906-01, GE Healthcare*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.2. Proteínas recombinantes CB1R-Ct-GST y RGS14-GST.

2.4.2.1. Clonaje del extremo Ct del receptor CB1R.

La región codificante del extremo carboxilo terminal del receptor cannabinoide CB1 fue amplificada (*Platinum Pfx DNA polymerase, Invitrogen Life Technologies*) mediante PCR a partir de ADN complementario de cerebro de ratón, utilizando los primers:

- CB1R-Ct 5' ATATGCGATCGCCAGGAGCAAGGACCTGAGACATGCTTTC 3'
5' TTGTGTTTAAACCAGAGCCTCGGCAGACGTGT 3', producto de 244 pb

La amplificación por PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos en *DNA Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania)* siguiendo el protocolo: un ciclo 1 min a 94° C; 30 ciclos 30 seg a 74° C, 30 seg a 58° C, 2 min a 72° C; una incubación final de 5 min a 72° C. El fragmento se insertó en el vector pFN2A (*Promega C8461*).

2.4.2.2. Clonaje de la proteína RGS14.

La región codificante de la proteína reguladora de la señalización de las proteínas G 14, la RGS14, fue amplificada (*Platinum Pfx DNA polymerase, Invitrogen Life Technologies*) mediante PCR a partir de ADN complementario de cerebro de ratón, utilizando los primers:

- RGS14 5' ATTGGCGATCGCCCAGGGAAGCCCAAGCACTTGGGT 3'
5' GACGGTTTAAACTGGTGGAGCCTCCCGAGAGC 3', producto de 1663 pb

La amplificación por PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos en *DNA Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania)* siguiendo el protocolo: un ciclo 1 min a 94° C; 30 ciclos 30 seg a 74° C, 45 seg a 60° C, 2 min a 72° C; una incubación final de 5 min a 72° C. El fragmento se insertó en el vector pFN2A (*Promega C8461*).

2.4.2.3. Obtención de las proteínas recombinantes.

Una colonia de bacterias BL21-KRX (*Promega L3002*) transformadas con el ADN recombinante se cultivó en medio líquido LB-ampicilina (extracto de levadura 5 g/l, triptona 10 g/l, NaCl 10 g/l, ampicilina 100 mg/l). Cuando el cultivo alcanzó una DO (densidad óptica)= 0,4-0,5 se indujo la expresión de la proteína de fusión con la adición de IPTG 0,1 mM y ramnosa 0,1 %. Tras una incubación de 16 horas a 25° C se centrifugaron las bacterias a 4000xg durante 20 minutos y se congelaron a -80° C. El *pellet* de bacterias congelado se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 8, Triton 1 %, Tween 0,5 %, DTT 3 mM, PMSF 1mM, 2,5 mg lisozima en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (*Sigma, P8340*). Se mantuvo 15 minutos en hielo y se añadió 0,375 g de *N-laurelyl-sarcosine* y se sonicó. Se trató con DNAsa 10 µg/ml en MgCl₂ 5 mM durante 30 minutos en hielo. Después de una centrifugación a 19000xg durante 20 minutos, las proteínas de fusión recuperadas en el sobrenadante se purificaron por cromatografía de afinidad mediante columnas Glutathion Sepharosa 4B (*GE Healthcare Life Sciences*). Fueron eluidas en gradiente de 0 a 10 mM de glutatión reducido. Se analizaron las fracciones obtenidas mediante *western blot* y se procesaron aquellas en las que la proteína recombinante estaba enriquecida.

Para la obtención de la proteína recombinante RGS14 libre de GST, se incubó con la proteasa TEV (*Promega V6051*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una fracción de las proteínas recombinantes se acoplaron a través del GST a agarosa (*NHS-activated sepharose 4 Fast Flow, 17-0906-01, GE Healthcare Life Sciences*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.3. Electroelución de la proteína recombinante.

En aquellos casos en los que la presencia de la proteína de interés era menor al 70 % respecto a las proteínas parásitas, se procedió a la purificación de la proteína recombinante por electroelución. Las proteínas eluidas se solubilizaron con Tris 25 mM, SDS 1 % durante 2 horas a 32° C (sin reductores) y se cargaron en un gel semipreparativo de acrilamida-bisacrilamida (*Bio-Rad, 161-0148*) al 11 %. La banda correspondiente a la proteína CB1R-GST se cortó del gel tras visualizarla con tinción de cobre (*Bio-Rad 161-0470*). La proteína se electroeluyó en *Electro Eluter Model 422* (*BioRad 165-2976*). Se redujo la concentración de SDS de la muestra obtenida mediante dilución y concentración (*Ultrasel 10000 NMWL UFC901096, Millipore Iberica S.A.*) y se guardó a -20° C.

2.5. Preparación de los componentes celulares para su análisis.

2.5.1. Fraccionamiento de las estructuras del SNC de ratón.

La sustancia gris periacueductal (PAG) es la estructura neural que juega un mayor papel mediando los efectos analgésicos de los opioides administrados por vía icv (*Yaksh y col., 1976*). En los tratamientos agudos la región neural estudiada fue el PAG, se extrajo 1 mm de tejido alrededor del acueducto de una sección de 2 mm. En los tratamientos crónicos la estructura que analizada fue la corteza cerebral. Para los ensayos de situaciones control también se utilizó la corteza cerebral. Ambas estructuras se procesaron de manera similar.

Los ratones fueron decapitados y las estructuras cerebrales extraídas. El tejido resuspendido en Tris-HCl 25 mM pH 7,5, sacarosa 0,32 M, PMSF 25 μ M, una mezcla de inhibidores de proteasas (*Sigma P8340*), una mezcla de inhibidores de fosfatasas (*Sigma P2850*); a 4° C, se disgregó con un homogeneizador *Polytron (PT10/35 Kinematica, Kriens-Luzern, Switzerland)* durante 15 segundos en el punto 3 de potencia.

Mediante centrifugación a 1000xg (*Sorvall RCSC, rotor SS34, Newton, CT, USA*) durante 10 minutos se separaron células residuales y núcleos formando un precipitado (P1) de los sinaptosomas, pequeños fragmentos de las membranas sinápticas que se recirculan formando vesículas, que quedaron en el sobrenadante (S1). El S1 se volvió a centrifugar a 20000xg durante 20 minutos para tener la fracción rica en sinaptosomas en el pellet (P2) y la fracción citosólica en el sobrenadante (S2). Después de un nuevo ciclo de lavado y resuspensión en el tampón, seguido de centrifugación a la misma velocidad, la fracción de membranas P2 se resuspendió en Tris-HCl 25mM pH 7,5 y leupeptina 10 μ M, a una concentración de proteína de 3-5 μ g/ μ l (*DC Protein Assay, BioRad, 500-0116*) y se congeló a -80° C hasta el momento de su empleo. El sobrenadante S2 se ultracentrifugó a 100.000xg (*Beckman XL-70 Ultracentrifuge, rotor Type 70ti*) para precipitar los microsomas (P3). Se determinó la concentración proteica del sobrenadante S3 y se congeló a -20° C hasta su empleo.

2.5.2. Subfraccionamiento de la fracción soluble del PAG de ratón.

El aislamiento de los orgánulos que componen la fracción citosólica de las células aporta información sobre las moléculas que los constituyen y la posibilidad de hacer un seguimiento de las proteínas que son endocitadas. Una vez que el tejido se homogeniza los componentes se separan según su tamaño y su forma (densidad) (adaptado de *Doyle y col., 1985*).

El sobrenadante (S3) se pasó a un tubo de ultracentrífuga en un gradiente continuo de 10-40% de sacarosa. Se centrifugó a 225000 g durante 18 horas. Se recogieron alícuotas de 4 mililitros. Se

concentraron a 500 microlitros (*Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, NMWL of 10.000, Millipore, UFC8 01024*), se determinó la concentración de proteínas (*DC Protein Assay, BioRad, 500-0116*) y se guardaron para su posterior procesamiento. Para determinar los componentes de cada fracción obtenida se usaron marcadores específicos de orgánulos celulares son: EEA1 (endosomas tempranos, *BD 610456*), Rab 5 (endosomas muy tempranos, *BD 610281*), Rab 4 (endosomas tempranos, *BD 610888*), Rab 11 (endosomas tardíos, *BD 610656*), Lamp-1 (lisosomas, *BD 610430*)

2.5.3. Purificación de proteínas glicosiladas de SNC de ratón.

La solubilización y la cromatografía de afinidad en columna de lectina de germen de trigo se realizó a partir de membranas neurales ricas en sinaptosomas (fracción P2) resuspendidas en tampón A con Tritón X-100 2 % (Tris-HCl 20 mM, EGTA 1 mM, NaCl 150 mM, PMSF 10 µM, cocktail de inhibidores de proteasas (*Sigma P8340*)). La muestra se incubó a 4° C durante 16 horas con agitación.

Se ultracentrifugó a 100.000xg (*Beckman XL-70 Ultracentrifuge, rotor Type 70ti*) durante una hora. El sobrenadante se filtró (*Sterivez-GV 0,22 µm, Millipore*), el clarificado se pasó con un flujo de 1,5 ml/min por una columna *WGL-sepharose 4B (GE Healthcare Life Sciences, 17-0444)* previamente equilibrada con 20 volúmenes del tampón A con Tritón X-100 al 1 %, CaCl₂ 1 mM y MnCl₂ 1 mM (Tampón B).

Las glicoproteínas retenidas en la columna fueron eluidas con N-acetilglucosamina 0,25 mM en tampón B y recogidas en fracciones de 1 ml. Tras determinar el contenido proteico por el método *Lowry (Lowry y col., 1951)*, las fracciones con mayor contenido se juntaron. Las proteínas se precipitaron con acetona 60 % fría y se centrifugó a 12000xg, 15 min a 4° C. Se congeló a -80° C hasta el momento de ser empleada en ensayos posteriores.

2.6. Ensayos de precipitación de proteínas.

2.6.1. Inmunoprecipitación de proteínas.

Las IgGs dirigidas frente a las proteínas diana se purificaron por afinidad frente al péptido antigénico y luego fueron acopladas a biotina (*Pierce 21217*) siguiendo las instrucciones del fabricante. 800 µg de proteínas de la fracción de membranas P2 o la fracción citosólica S3 fueron solubilizadas en 2 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, Nonidet NP-40 1 % (detergente no iónico), con una mezcla de inhibidores de proteasas (*Sigma P8340*) y una mezcla de inhibidores de fosfatasa (*Sigma P2850*). El solubilizado se sometió a 2 ciclos de sonicación de 10 segundos y se dejó en agitación a 4° C o/n (*over night*). Para evitar uniones inespecíficas se realizó un aclarado preliminar de los lisados durante 1 hora a 4° C con 30 µl de estreptavidina agarosa (*GE Healthcare 17-5113-01*),

que se une a moléculas de biotina (anticuerpos biotinados), o proteína A/G agarosa (*GE Healthcare 17-0469-01*), que se une a la región constante de las IgGs (en los ensayos con anticuerpos sin biotinar). Las muestras se centrifugaron a 10000xg durante 10 minutos. Los sobrenadantes se incubaron, en agitación moderada, 18 horas y a 4° C, con 2,5 µg de IgG biotinadas o con IgG no biotinadas. Se añadieron 50 µl de estreptavidina o proteína A/G agarosa y se volvió a incubar durante 2 horas a 4° C. Tras este tiempo se centrifugaron a 4300xg durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Los precipitados de agarosa se transfieren a otros viales donde se sometieron a 5 ciclos de lavado de 20 minutos en 1 ml del tampón anterior seguido de centrifugación para eliminar el material unido de forma inespecífica.

Los inmunocomplejos obtenidos tras la precipitación con la estreptavidina se separaron de las IgGs por desnaturalización por calor en un tampón Tris-HCl 40 mM pH 7,5, SDS 1 % a 100° C durante 10 minutos. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas de la agarosa-IgG mediante filtrado de 0,45 µm de poro (Ultrafree-MC UFC30GV, *Millipore*). Para evitar la interferencia en el revelado de los *Western blot* de las IgG biotinadas que pudieran haberse roto se añadió el mismo volumen de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM y octiltiogluósido 0,65 % y 30 µl más de estreptavidina-agarosa. Se incubó durante 4 horas a 4° C y tras ese tiempo se centrifugó a 10000xg para eliminar la agarosa junto con las IgG biotinadas. El sobrenadante con las proteínas de interés se concentró con el sistema Ultrafree-MC 10000 NMWL (*Millipore Iberica S.A.*). Se solubilizó para su análisis por SDS-PAGE. Este procedimiento es suficiente para cargar 4 calles de un gel de acrilamida.

Los inmunocomplejos obtenidos tras la precipitación con la proteína A/G-agarosa se solubilizaron en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 3 %, azul de bromofenol 0,005 % y se calentaron a 100° C durante 10 minutos. Las muestras se filtraron por 0,45 µm (Ultrafree-MC UFC30GV, *Millipore*) para separar la agarosa de las proteínas inmunoprecipitadas. El filtrado se analizó por SDS-PAGE en geles de acrilamida-bisacrilamida.

2.6.2. Inmunoprecipitación de proteínas en condiciones desnaturalizantes.

Para los estudios en los que se requería precipitar exclusivamente la proteína de interés, el tejido se solubilizó en condiciones desnaturalizantes con el fin de eliminar a las proteínas que co-precipitan con ella.

Las fracciones P2, ricas en sinaptosomas, y S3, fracción soluble, se calentaron en Tris-HCl 40 mM, SDS 1 % durante 10 minutos a 100° C en condiciones reductoras, 2-mercaptoetanol al 3 %. Para permitir que las IgG se unieran a las proteínas diana, la concentración de SDS se redujo añadiendo octiltiogluósido a un porcentaje final de 0,65 %. Bajo estas condiciones se comprobó que la

probabilidad de que proteínas desnaturalizadas puedan reasociarse es muy baja. La inmunoprecipitación de estas proteínas se llevó a cabo con las correspondientes IgG biotinadas siguiendo el protocolo descrito en el punto anterior.

2.6.3. Ensayos de *pull down*.

En estos estudios se parte de proteínas recombinantes que ya tienen acopladas la agarosa. Tras la solubilización, se realiza el aclarado con agarosa y se incuban las muestras con 50 µl de RalGDS-agarosa o B-Raf-agarosa durante 18 horas a 4° C. Pasado este tiempo, se puede centrifugar y realizar los ciclos de lavado. El último precipitado se resuspende en el tampón de carga directamente para su análisis por SDS-PAGE.

2.7. Detección de proteínas en cerebro de ratón. Electroforesis de proteínas y transferencia a soporte sólido (*Western blotting*).

Las muestras se solubilizaron en un tampón de carga Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 3 %, azul de bromofenol 0,005 % a 100° C durante 10 minutos. Las muestras solubilizadas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE (*Polyacrylamide gel electrophoresis*). En geles del 7-14 % de acrilamida total y 2,6 % de bisacrilamida, de 0,15x12x10 cm o en geles Bis/Tris 4-12 % (*Invitrogen NuPAGE NPO341*) para proteínas de bajo peso molecular. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de polivinil-difluoruro de 0,45 µm (PVDF, *Polyvinylidene difluoride. GE Healthcare, RPN303F*). Las membranas son bloqueadas con proteínas de leche deshidratada y delipidada (*Blocker, BioRad, 170-6404*) al 5 % en TBS-Tween 20 0,05 % (TTBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La detección inmunológica se hizo mediante la incubación de un anticuerpo específico diluído en TTBS durante 12-48 horas a 4° C en abierto o en *Decaprobe Chambers (Hoefer-GE Healthcare PR150)*. Después una incubación de 2 horas con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina diluído 1:10000 en TTBS acoplado a la enzima fosfatasa alcalina (*Promega*) o a la peroxidasa (*Cellular Signalling*) para un revelado cromogénico (*Promega*) en el primer caso y revelado por quimioluminiscencia (*ECL Plus Western blotting Detention System, GE Healthcare RPN2132*) en el segundo. Las imágenes fueron visualizadas mediante una cámara CCD empleando un sistema ChemiImager IS-5500 (*Alpha Innotech Corp., San Leandro, California*) y analizadas por densitometría (*AlphaEase v3.2.2*). El control de carga en los análisis de proteína total en membrana P2 se verificó analizando la α -actina (*Stressgen CSA-400*). Para los ensayos en los que el tratamiento modificó la presencia de la proteína inmunoprecipitada se verificó la igualdad de carga. Cuando fue necesario la señal se ajustó usando la detección de la cadena pesada de las IgG usada para precipitarla. Estos ensayos se repitieron al menos dos veces con muestras obtenidas de grupos de ratones independientes.

2.8. Ensayos *in vitro*.

Se estudió el efecto del aumento de concentraciones de zinc en la asociación del receptor MOR con las PKC. Membranas neurales ricas en sinaptosomas de PAG se solubilizaron en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, Nonidet P-40 1 % durante 16 horas a 4° C. Se añadió ZnCl₂ (*Zinc chloride, Puratronic, Alfa Aesar 231-592-0*) junto con las IgG anti-MOR biotinadas y se incubó a 4° C durante 4 horas. Los inmunocomplejos se recogieron con estreptavidina-agarosa, se separaron y solubilizaron como se ha descrito anteriormente. Se analizó el resultado por *Western blotting*.

Los inhibidores de PKC, calfofostina C (*Merk-Calbiochem 208725*) a 50 nM, Gö7874 (*Merk-Calbiochem 265252*) a 4 nM y cheleritrina (*Merk-Calbiochem 220285*) 0,7 µM se añadieron a la muestra solubilizada una hora antes que el ZnCl₂.

Los donantes de óxido nítrico S-nitroso-N-acetilpenicilamina (*SNAP, Tocris Bioscience 0598*) y NOR-3 (*Merk-Calbiochem 489530*) a concentraciones de a 30-100 µM se añadieron a las muestras solubilizadas y se incubaron toda la noche junto con las IgG del MOR.

Los quelantes de iones metálicos N,N,N',N'-tetrakis (2-piridilmetil) etilendiamina (*TPEN, Fluka WA16827*) en concentraciones crecientes de 1 a 100 µM y 1,10 fenantrolina (*Sigma-Aldrich 13,137-7*) de 100 µM a 3 mM se añadieron a las muestras junto con el ZnCl₂ o el SNAP.

El éster de forbol, PMA (acetato de forbol miristato, *Calbiochem 524400*) se usó a una concentración de 0,5 µM que activa eficazmente las isoformas de la PKC.

2.9. Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (PCRQ).

Los primers para la PCRQ se diseñaron mediante el programa Primer-Express_software (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) y fueron sintetizados por *Sigma-Genosys*:

- Rgs 10: 5' TCTGAAACCCAAGCGAACTGA Y 5' TCGCTTAGCTGCGGTCTGA 3'. La amplificación con este par de oligonucleótidos genera un fragmento de 66 pb.
- Rgs 12: 5' GGCTGGATCTCGTTCCGATT 3' y 5' CCGCAACACTTCCGTGACT 3'. La amplificación con este par de oligonucleótidos genera un fragmento de 76 pb.
- Rgs 14: 5' TTCAGCGCAGAGAACGTAACCTTT 3' y 5' TGTCGCTGGCTGGGATCT 3'. La amplificación con este par de oligonucleótidos genera un fragmento de 66 pb.
- Actina: 5' AGGTGTGATGGTGGGAATGG 3' y 5' GCCTCGTCACCCACATAGGA 3'. La amplificación con este par de oligonucleótidos genera un fragmento de 66 pb.

El ARN mensajero de cerebro fue extraído mediante el sistema *UltraspecTM RNA Isolation system* (Biotecx Labs, Houston, Texas, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. 2 µg de ARN total fue transcrito a ADN complementario (ADNc) usando RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante. En estos estudios se utilizó el *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Los componentes se combinaron para obtener 21 µl de mezcla de reacción por cada pocillo de una placa 96-pocillos. Las muestras de ADN problema se pusieron por triplicado, 4µl de ADNc de cerebro en diluciones escaladas (1:5). La placas fueron selladas y colocadas en el detector ABI 7000 Sequence Detector . Se realizaron 40 ciclos (95° C, 15 s; 52° C 1 min) tras una desnaturalización inicial a 95° C durante 10 minutos. Mediante el ABI 7000 softwares se calculó el valor Ct (*cycle threshold*, ciclo umbral) el valor matemático inversamente proporcional al número de copias génicas de la muestra original, suelen poseer una incertidumbre sobre la medida mínima, en general inferior al 5 %. Los resultados se normalizaron con actina.

Bibliografía

- Abe, T., et al. "Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain." *Eur.J.Neurosci.* 22.6 (2005): 1445-54.
- Abood, M. E. and B. R. Martin. "Neurobiology of marijuana abuse." *Trends Pharmacol.Sci.* 13.5 (1992): 201-06.
- Adams, J. P. and J. D. Sweatt. "Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory." *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 42 (2002): 135-63.
- Ahmed, S., et al. "The cysteine-rich domain of human proteins, neuronal chimaerin, protein kinase C and diacylglycerol kinase binds zinc. Evidence for the involvement of a zinc-dependent structure in phorbol ester binding." *Biochem.J.* 280 (Pt 1) (1991): 233-41.
- Ahn, S., et al. "Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling." *J.Biol.Chem.* 274.3 (1999): 1185-88.
- Ajit, S. K., et al. "RGSZ1 interacts with protein kinase C interacting protein PKCI-1 and modulates mu opioid receptor signaling." *Cell Signal.* 19.4 (2007): 723-30.
- Akil, H., D. J. Mayer, and J. C. Liebeskind. "Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist." *Science* 191.4230 (1976): 961-62.
- Alblas, J., et al. "Gi-mediated activation of the p21ras-mitogen-activated protein kinase pathway by alpha 2-adrenergic receptors expressed in fibroblasts." *J.Biol.Chem.* 268.30 (1993): 22235-38.
- Ali, D. W. and M. W. Salter. "NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity." *Curr.Opin.Neurobiol.* 11.3 (2001): 336-42.
- Ananthanarayanan, B., et al. "Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains." *J.Biol.Chem.* 278.47 (2003): 46886-94.
- Antonelli, V., et al. "Activation of B-Raf and regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the G (o) alpha chain." *Mol.Biol.Cell* 11.4 (2000): 1129-42.
- Anwyl, R. "Induction and expression mechanisms of postsynaptic NMDA receptor-independent homosynaptic long-term depression." *Prog.Neurobiol.* 78.1 (2006): 17-37.
- Arden, J. R., et al. "Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells." *J.Neurochem.* 65.4 (1995): 1636-45.
- Arendt, M., et al. "Cannabis-induced psychosis and subsequent schizophrenia-spectrum disorders: follow-up study of 535 incident cases." *Br.J.Psychiatry* 187 (2005): 510-15.
- Axelrod, J. D., et al. "Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways." *Genes Dev.* 12.16 (1998): 2610-22.
- Bailey, C. P., E. Kelly, and G. Henderson. "Protein kinase C activation enhances morphine-induced rapid desensitization of mu-opioid receptors in mature rat locus ceruleus neurons." *Mol.Pharmacol.* 66.6 (2004): 1592-98.
- Bailey, C. P., et al. "How important is protein kinase C in mu-opioid receptor desensitization and morphine tolerance?" *Trends Pharmacol.Sci.* 27.11 (2006): 558-65.
- Ballon, D. R., et al. "DEP-domain-mediated regulation of GPCR signaling responses." *Cell* 126.6 (2006): 1079-93.
- Bambico, F. R., et al. "Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex." *J.Neurosci.* 27.43 (2007): 11700-11.
- Bandler, R. and M. T. Shipley. "Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?" *Trends Neurosci.* 17.9 (1994): 379-89.
- Banke, T. G., et al. "Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase." *J.Neurosci.* 20.1 (2000): 89-102.
- Bao, G., et al. "Morphine and heroin differentially modulate in vivo hippocampal LTP in opiate-dependent rat." *Neuropsychopharmacology* 32.8 (2007): 1738-49.
- Barker, S. A., et al. "RGSZ1 and Ret RGS: two of several splice variants from the gene RGS20." *Genomics* 78.3 (2001): 223-29.
- Barnard, D., et al. "Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms." *Oncogene* 17.12 (1998): 1539-47.
- Bass, C. E. and B. R. Martin. "Time course for the induction and maintenance of tolerance to Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice." *Drug Alcohol Depend.* 60.2 (2000): 113-19.

- Bayer, K. U., et al. "Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation." *Nature* 411.6839 (2001): 801-05.
- Beattie, E. C., et al. "Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD." *Nat.Neurosci.* 3.12 (2000): 1291-300.
- Belcheva, M. M., Y. H. Wong, and C. J. Coscia. "Evidence for transduction of mu but not kappa opioid modulation of extracellular signal-regulated kinase activity by G(z) and G(12) proteins." *Cell Signal.* 12.7 (2000): 481-89.
- Belcheva, M. M., et al. "mu-Opioid receptor-mediated ERK activation involves calmodulin-dependent epidermal growth factor receptor transactivation." *J.Biol.Chem.* 276.36 (2001): 33847-53.
- Belcheva, M. M., et al. "Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAPK via different protein kinase C isoforms and secondary messengers in astrocytes." *J.Biol.Chem.* 280.30 (2005): 27662-69.
- Bernardi, M., et al. "Blockade of the polyamine site of NMDA receptors produces antinociception and enhances the effect of morphine, in mice." *Eur.J.Pharmacol.* 298.1 (1996): 51-55.
- Berrocso, E., et al. "Opiates as antidepressants." *Curr.Pharm.Des* 15.14 (2009): 1612-22.
- Bi, R., et al. "Src-mediated tyrosine phosphorylation of NR2 subunits of N-methyl-D-aspartate receptors protects from calpain-mediated truncation of their C-terminal domains." *J.Biol.Chem.* 275.34 (2000): 26477-83.
- Bilecki, W., et al. "Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment." *Cell Mol.Life Sci.* 62.19-20 (2005): 2369-75.
- Bilsky, E. J., et al. "Competitive and non-competitive NMDA antagonists block the development of antinociceptive tolerance to morphine, but not to selective mu or delta opioid agonists in mice." *Pain* 68.2-3 (1996): 229-37.
- Bliss, T. V., G. L. Collingridge, and R. G. Morris. "Introduction. Long-term potentiation and structure of the issue." *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 358.1432 (2003): 607-11.
- Boehm, J., et al. "Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1." *Neuron* 51.2 (2006): 213-25.
- Bohn, L. M., et al. "Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence." *Nature* 408.6813 (2000): 720-23.
- Bohn, L. M., R. J. Lefkowitz, and M. G. Caron. "Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knock-out mice." *J.Neurosci.* 22.23 (2002): 10494-500.
- Bolshakov, V. Y., et al. "Dual MAP kinase pathways mediate opposing forms of long-term plasticity at CA3-CA1 synapses." *Nat.Neurosci.* 3.11 (2000): 1107-12.
- Bouaboula, M., et al. "Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1." *Biochem.J.* 312 (Pt 2) (1995): 637-41.
- Boyce, S., et al. "Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn." *Neuropharmacology* 38.5 (1999): 611-23.
- Bradbury, A. F., D. G. Smyth, and C. R. Snell. "Biosynthetic origin and receptor conformation of methionine enkephalin." *Nature* 260.5547 (1976): 165-66.
- Bredt, D. S. and R. A. Nicoll. "AMPA receptor trafficking at excitatory synapses." *Neuron* 40.2 (2003): 361-79.
- Breivik, H., et al. "Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment." *Eur.J.Pain* 10.4 (2006): 287-333.
- Brennan, J. E., et al. "Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein." *J.Neurosci.* 16.23 (1996): 7407-15.
- Brennan, L. A., et al. "Nitric oxide activates p21ras and leads to the inhibition of endothelial NO synthase by protein nitration." *DNA Cell Biol.* 22.5 (2003): 317-28.
- Bruggemann, I., et al. "Colocalization of the mu-opioid receptor and calcium/calmodulin-dependent kinase II in distinct pain-processing brain regions." *Brain Res.Mol.Brain Res.* 85.1-2 (2000): 239-50.
- Brusco, A., et al. "Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus." *Synapse* 62.12 (2008): 944-49.
- Burchett, S. A. "In through the out door: nuclear localization of the regulators of G protein signaling." *J.Neurochem.* 87.3 (2003): 551-59.

- Buzas, B., J. Rosenberger, and B. M. Cox. "Mu and delta opioid receptor gene expression after chronic treatment with opioid agonist." *Neuroreport* 7.9 (1996): 1505-08.
- Cadogan, A. K., et al. "Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum." *J.Neurochem.* 69.3 (1997): 1131-37.
- Capeyrou, R., et al. "Agonist-induced signaling and trafficking of the mu-opioid receptor: role of serine and threonine residues in the third cytoplasmic loop and C-terminal domain." *FEBS Lett.* 415.2 (1997): 200-05.
- Carman, C. V., et al. "Selective regulation of G α (q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2." *J.Biol.Chem.* 274.48 (1999): 34483-92.
- Casey, P. J., et al. "Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties." *J.Biol.Chem.* 265.4 (1990): 2383-90.
- Celver, J., et al. "Distinct domains of the mu-opioid receptor control uncoupling and internalization." *Mol.Pharmacol.* 65.3 (2004): 528-37.
- Celver, J. P., et al. "Threonine 180 is required for G-protein-coupled receptor kinase 3- and beta-arrestin 2-mediated desensitization of the mu-opioid receptor in *Xenopus* oocytes." *J.Biol.Chem.* 276.7 (2001): 4894-900.
- Chakrabarti, S., P. Y. Law, and H. H. Loh. "Distinct differences between morphine- and [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly^{-o15}]-enkephalin-mu-opioid receptor complexes demonstrated by cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation." *J.Neurochem.* 71.1 (1998): 231-39.
- Chalecka-Franaszek, E., et al. "Immunoprecipitation of high-affinity, guanine nucleotide-sensitive, solubilized mu-opioid receptors from rat brain: coimmunoprecipitation of the G proteins G α (o), G α (i1), and G α (i3)." *J.Neurochem.* 74.3 (2000): 1068-78.
- Chatterjee, T. K. and R. A. Fisher. "Cytoplasmic, nuclear, and golgi localization of RGS proteins. Evidence for N-terminal and RGS domain sequences as intracellular targeting motifs." *J.Biol.Chem.* 275.31 (2000): 24013-21.
- Chavkin, C., J. P. McLaughlin, and J. P. Celver. "Regulation of opioid receptor function by chronic agonist exposure: constitutive activity and desensitization." *Mol.Pharmacol.* 60.1 (2001): 20-25.
- Cheer, J. F., et al. "Differential cannabinoid-induced electrophysiological effects in rat ventral tegmentum." *Neuropharmacology* 44.5 (2003): 633-41.
- Chen, H. J., et al. "A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II." *Neuron* 20.5 (1998): 895-904.
- Chen, L. and L. Y. Huang. "Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid." *Neuron* 7.2 (1991): 319-26.
- Chen, L. and L. Y. Huang. "Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation." *Nature* 356.6369 (1992): 521-23.
- Chen, S. and H. E. Hamm. "DEP domains: More than just membrane anchors." *Dev.Cell* 11.4 (2006): 436-38.
- Cheung, H. H. and J. W. Gurd. "Tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor by exogenous and postsynaptic density-associated Src-family kinases." *J.Neurochem.* 78.3 (2001): 524-34.
- Cho, H., et al. "RGS14, a GTPase-activating protein for G α 1, attenuates G α 1- and G α 13-mediated signaling pathways." *Mol.Pharmacol.* 58.3 (2000): 569-76.
- Cho, H., D. U. Kim, and J. H. Kehrl. "RGS14 is a centrosomal and nuclear cytoplasmic shuttling protein that traffics to promyelocytic leukemia nuclear bodies following heat shock." *J.Biol.Chem.* 280.1 (2005): 805-14.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., et al. "Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice." *J.Clin.Invest* 115.3 (2005): 680-87.
- Chuang, T. T., H. LeVine, III, and Blasi A. De. "Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C." *J.Biol.Chem.* 270.31 (1995): 18660-65.
- Commons, K. G., E. J. van Bockstaele, and D. W. Pfaff. "Frequent colocalization of mu opioid and NMDA-type glutamate receptors at postsynaptic sites in periaqueductal gray neurons." *J.Comp Neurol.* 408.4 (1999): 549-59.
- Compton, D. R., et al. "Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 265.1 (1993): 218-26.
- Coutts, A. A., et al. "Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons." *J.Neurosci.* 21.7 (2001): 2425-33.
- Cox, B. M., M. Ginsburg, and O. H. Osman. "Acute tolerance to narcotic analgesic drugs in rats." *Br.J.Pharmacol.Chemother.* 33.2 (1968): 245-56.

- Cox, B. M., et al. "Further characterization of morphine-like peptides (endorphins) from pituitary." *Brain Res.* 115.2 (1976): 285-96.
- Crespo, P., et al. "Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits." *Nature* 369.6479 (1994): 418-20.
- Csermely, P., et al. "Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes." *J.Biol.Chem.* 263.14 (1988a): 6487-90.
- Csermely, P., et al. "Zinc increases the affinity of phorbol ester receptor in T lymphocytes." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 154.2 (1988b): 578-83.
- Culine, S., et al. "Expression of the ras-related rap genes in human tumors." *Int.J.Cancer* 44.6 (1989): 990-94.
- D'A mour, F. E. and Smith, D. L. "A method for determining loss of pain sensation." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 72 (1941): 74-79
- Dang, V. C., I. A. Napier, and M. J. Christie. "Two distinct mechanisms mediate acute mu-opioid receptor desensitization in native neurons." *J.Neurosci.* 29.10 (2009): 3322-27.
- Dawson, D. C. "Ion channels and colonic salt transport." *Annu.Rev.Physiol* 53 (1991): 321-39.
- De, Vries L., et al. "GAIP is membrane-anchored by palmitoylation and interacts with the activated (GTP-bound) form of G alpha i subunits." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93.26 (1996): 15203-08.
- De, Vries L., et al. "GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95.21 (1998a): 12340-45.
- De, Vries L., et al. "RGS-GAIP, a GTPase-activating protein for Galpha heterotrimeric G proteins, is located on clathrin-coated vesicles." *Mol.Biol.Cell* 9.5 (1998b): 1123-34.
- De, Vry J., et al. "Behavioral effects of cannabinoids show differential sensitivity to cannabinoid receptor blockade and tolerance development." *Behav.Pharmacol.* 15.1 (2004): 1-12.
- Delgado, J. Y., et al. "NMDA receptor activation dephosphorylates AMPA receptor glutamate receptor 1 subunits at threonine 840." *J.Neurosci.* 27.48 (2007): 13210-21.
- Demuth, D. G. and A. Molleman. "Cannabinoid signalling." *Life Sci.* 78.6 (2006): 549-63.
- Derkach, V., A. Barria, and T. R. Soderling. "Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96.6 (1999): 3269-74.
- Devane, W. A., et al. "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." *Mol.Pharmacol.* 34.5 (1988): 605-13.
- Devane, W. A., et al. "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." *Science* 258.5090 (1992): 1946-49.
- DeWire, S. M., et al. "Beta-arrestins and cell signaling." *Annu.Rev.Physiol* 69 (2007): 483-510.
- Dhawan, B. N., et al. "International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors." *Pharmacol.Rev.* 48.4 (1996): 567-92.
- Dong, Y. N., E. A. Waxman, and D. R. Lynch. "Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor." *J.Neurosci.* 24.49 (2004): 11035-45.
- Dosemeci, A. and T. S. Reese. "Effect of calpain on the composition and structure of postsynaptic densities." *Synapse* 20.1 (1995): 91-97.
- Douppnik, C. A., T. Xu, and J. M. Shinaman. "Profile of RGS expression in single rat atrial myocytes." *Biochim.Biophys.Acta* 1522.2 (2001): 97-107.
- Douppnik, C. A., C. Jaen, and Q. Zhang. "Measuring the modulatory effects of RGS proteins on GIRK channels." *Methods Enzymol.* 389 (2004): 131-54.
- Doyle, D. D., et al. "Separation of cardiac plasmalemma into cell surface and T-tubular components. Distribution of saxitoxin- and nitrendipine-binding sites." *J.Biol.Chem.* 261.14 (1986): 6556-63.
- Drenan, R. M., et al. "Palmitoylation regulates plasma membrane-nuclear shuttling of R7BP, a novel membrane anchor for the RGS7 family." *J.Cell Biol.* 169.4 (2005): 623-33.
- Egashira, N., et al. "Intracerebral microinjections of delta 9-tetrahydrocannabinol: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats." *Brain Res.* 952.2 (2002): 239-45.
- Egertova, M. and M. R. Elphick. "Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB." *J.Comp Neurol.* 422.2 (2000): 159-71.

- Eichmann, T., et al. "The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site." *J.Biol.Chem.* 278.10 (2003): 8052-57.
- el, Kouhen R., et al. "Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 residues within the carboxyl tail differentially regulates mu-opioid receptor internalization." *J.Biol.Chem.* 276.16 (2001): 12774-80.
- Elliott, K., et al. "The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids." *Pain* 56.1 (1994): 69-75.
- Elmes, S. J., et al. "Cannabinoid CB2 receptor activation inhibits mechanically evoked responses of wide dynamic range dorsal horn neurons in naive rats and in rat models of inflammatory and neuropathic pain." *Eur.J.Neurosci.* 20.9 (2004): 2311-20.
- English, J. D. and J. D. Sweatt. "Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation." *J.Biol.Chem.* 271.40 (1996): 24329-32.
- English, J. D. and J. D. Sweatt. "A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation." *J.Biol.Chem.* 272.31 (1997): 19103-06.
- Evans, C. J., et al. "Cloning of a delta opioid receptor by functional expression." *Science* 258.5090 (1992): 1952-55.
- Fabian, J. R., I. O. Daar, and D. K. Morrison. "Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase." *Mol.Cell Biol.* 13.11 (1993): 7170-79.
- Fan, F., et al. "Cannabinoid receptor down-regulation without alteration of the inhibitory effect of CP 55,940 on adenylyl cyclase in the cerebellum of CP 55,940-tolerant mice." *Brain Res.* 706.1 (1996): 13-20.
- Fan, G., et al. "c-Src tyrosine kinase binds the beta 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization." *J.Biol.Chem.* 276.16 (2001): 13240-47.
- Fan, G. H., et al. "Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence." *Mol.Pharmacol.* 56.1 (1999): 39-45.
- Fedele, E. and M. Raiteri. "In vivo studies of the cerebral glutamate receptor/NO/cGMP pathway." *Prog.Neurobiol.* 58.1 (1999): 89-120.
- Felder, C. C., et al. "Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors." *Mol.Pharmacol.* 48.3 (1995): 443-50.
- Ferguson, S. S., et al. "Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization." *Life Sci.* 62.17-18 (1998): 1561-65.
- Finn, A. K. and J. L. Whistler. "Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal." *Neuron* 32.5 (2001): 829-39.
- Fischer, T., et al. "Promotion of G alpha i3 subunit down-regulation by GIPN, a putative E3 ubiquitin ligase that interacts with RGS-GAIP." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100.14 (2003): 8270-75.
- Franke, B., J. W. Akkerman, and J. L. Bos. "Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets." *EMBO J.* 16.2 (1997): 252-59.
- Frederickson, C. J., J. Y. Koh, and A. I. Bush. "The neurobiology of zinc in health and disease." *Nat.Rev.Neurosci.* 6.6 (2005): 449-62.
- Fukuda, K., et al. "Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells." *J.Neurochem.* 67.3 (1996): 1309-16.
- Furukawa, H., et al. "Subunit arrangement and function in NMDA receptors." *Nature* 438.7065 (2005): 185-92.
- Galiegue, S., et al. "Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations." *Eur.J.Biochem.* 232.1 (1995): 54-61.
- Garthwaite, J., et al. "NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices." *Eur.J.Pharmacol.* 172.4-5 (1989): 413-16.
- Garzon, J., Y. Martinez-Pena, and P. Sanchez-Blazquez. "Dissimilar efficacy of opioids to produce mu-mediated analgesia: role of Gx/z and Gi2 transducer proteins." *Life Sci.* 55.11 (1994): L205-L212.
- Garzon, J., et al. "Antibodies to the cloned mu-opioid receptor detect various molecular weight forms in areas of mouse brain." *Mol.Pharmacol.* 47.4 (1995): 738-44.

- Garzon, J., Y. Martinez-Pena, and P. Sanchez-Blazquez. "Gx/z is regulated by mu but not delta opioid receptors in the stimulation of the low Km GTPase activity in mouse periaqueductal grey matter." *Eur.J.Neurosci.* 9.6 (1997a): 1194-200.
- Garzon, J., A. Garcia-Espana, and P. Sanchez-Blazquez. "Opioids binding mu and delta receptors exhibit diverse efficacy in the activation of Gi2 and G(x/z) transducer proteins in mouse periaqueductal gray matter." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 281.1 (1997b): 549-57.
- Garzon, J., M. Castro, and P. Sanchez-Blazquez. "Influence of Gz and Gi2 transducer proteins in the affinity of opioid agonists to mu receptors." *Eur.J.Neurosci.* 10.8 (1998): 2557-64.
- Garzon, J. and P. Sanchez-Blazquez. "Administration of myr(+)-G(i2)alpha subunits prevents acute tolerance (tachyphylaxis) to mu-opioid effects in mice." *Neuropharmacology* 40.4 (2001): 560-69.
- Garzon, J., et al. "RGS9 proteins facilitate acute tolerance to mu-opioid effects." *Eur.J.Neurosci.* 13.4 (2001): 801-11.
- Garzon, J., et al. "Glycosylated phosducin-like protein long regulates opioid receptor function in mouse brain." *Neuropharmacology* 42.6 (2002): 813-28.
- Garzon, J., A. Lopez-Fando, and P. Sanchez-Blazquez. "The R7 subfamily of RGS proteins assists tachyphylaxis and acute tolerance at mu-opioid receptors." *Neuropsychopharmacology* 28.11 (2003): 1983-90.
- Garzon, J., et al. "RGSZ1 and GAIP regulate mu- but not delta-opioid receptors in mouse CNS: role in tachyphylaxis and acute tolerance." *Neuropsychopharmacology* 29.6 (2004): 1091-104.
- Garzon, J., et al. "Effector antagonism by the regulators of G protein signalling (RGS) proteins causes desensitization of mu-opioid receptors in the CNS." *Psychopharmacology (Berl)* 180.1 (2005a): 1-11.
- Garzon, J., M. Rodriguez-Munoz, and P. Sanchez-Blazquez. "Morphine alters the selective association between mu-opioid receptors and specific RGS proteins in mouse periaqueductal gray matter." *Neuropharmacology* 48.6 (2005b): 853-68.
- Garzon, J., et al. "The RGSZ2 protein exists in a complex with mu-opioid receptors and regulates the desensitizing capacity of Gz proteins." *Neuropsychopharmacology* 30.9 (2005c): 1632-48.
- Garzon, J., et al. "Activation of mu-opioid receptors transfers control of Galpha subunits to the regulator of G-protein signaling RGS9-2: role in receptor desensitization." *J.Biol.Chem.* 280.10 (2005d): 8951-60.
- Garzon, J., M. Rodriguez-Munoz, and P. Sanchez-Blazquez. "Do pharmacological approaches that prevent opioid tolerance target different elements in the same regulatory machinery?" *Curr.Drug Abuse Rev.* 1.2 (2008): 222-38.
- Georgoussi, Z., G. Milligan, and C. Zioudrou. "Immunoprecipitation of opioid receptor-Go-protein complexes using specific GTP-binding-protein antisera." *Biochem.J.* 306 (Pt 1) (1995): 71-75.
- Georgoussi, Z., et al. "Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the mu- and delta-opioid receptors regulate opioid receptor signaling." *Cell Signal.* 18.6 (2006): 771-82.
- Gerdeman, G. and D. M. Lovinger. "CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum." *J.Neurophysiol.* 85.1 (2001): 468-71.
- Gierschik, P., et al. "Immunochemical evidence for a novel pertussis toxin substrate in human neutrophils." *J.Biol.Chem.* 261.17 (1986): 8058-62.
- Giudice, A., et al. "Identification and characterization of alternatively spliced murine Rgs11 isoforms: genomic structure and gene analysis." *Cytogenet.Cell Genet.* 94.3-4 (2001): 216-24.
- Glass, M., M. Dragunow, and R. L. Faull. "Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain." *Neuroscience* 77.2 (1997): 299-318.
- Gold, S. J., et al. "Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain." *J.Neurosci.* 17.20 (1997): 8024-37.
- Goldstein, A., et al. "Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76.12 (1979): 6666-70.
- Grabowska, D., et al. "Postnatal induction and localization of R7BP, a membrane-anchoring protein for regulator of G protein signaling 7 family-Gbeta5 complexes in brain." *Neuroscience* 151.4 (2008): 969-82.
- Gracy, K. N., A. L. Svingos, and V. M. Pickel. "Dual ultrastructural localization of mu-opioid receptors and NMDA-type glutamate receptors in the shell of the rat nucleus accumbens." *J.Neurosci.* 17.12 (1997): 4839-48.

- Granados-Soto, V., et al. "Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion." *Pain* 85.3 (2000): 395-404.
- Guang, W., et al. "Role of mPKCI, a novel mu-opioid receptor interactive protein, in receptor desensitization, phosphorylation, and morphine-induced analgesia." *Mol.Pharmacol.* 66.5 (2004): 1285-92.
- Gundelfinger, E. D., et al. "A role for zinc in postsynaptic density assembly and plasticity?" *Trends Biochem.Sci.* 31.7 (2006): 366-73.
- Guo, F. F., E. Kumahara, and D. Saffen. "A CalDAG-GEFI/Rap1/B-Raf cassette couples M(1) muscarinic acetylcholine receptors to the activation of ERK1/2." *J.Biol.Chem.* 276.27 (2001): 25568-81.
- Guttman, R. P., et al. "Specific proteolysis of the NR2 subunit at multiple sites by calpain." *J.Neurochem.* 78.5 (2001): 1083-93.
- Haddad, J. J. "N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways: a revolving neurochemical axis for therapeutic intervention?" *Prog.Neurobiol.* 77.4 (2005): 252-82.
- Hajos, N., et al. "Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations." *Eur.J.Neurosci.* 12.9 (2000): 3239-49.
- Hamm, H. E. and A. Gilchrist. "Heterotrimeric G proteins." *Curr.Opin.Cell Biol.* 8.2 (1996): 189-96.
- Hanus, L., et al. "2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98.7 (2001): 3662-65.
- Hausdorff, W. P., M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz. "Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function." *FASEB J.* 4.11 (1990): 2881-89.
- Hawes, B. E., et al. "Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway." *J.Biol.Chem.* 271.21 (1996): 12133-36.
- Hayashi, Y., et al. "Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction." *Science* 287.5461 (2000): 2262-67.
- Heinricher, M. M., M. M. Morgan, and H. L. Fields. "Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception." *Neuroscience* 48.3 (1992): 533-43.
- Heinricher, M. M., J. C. Schouten, and E. E. Jobst. "Activation of brainstem N-methyl-D-aspartate receptors is required for the analgesic actions of morphine given systemically." *Pain* 92.1-2 (2001): 129-38.
- Hendry, I. A., et al. "Hypertolerance to morphine in G(z alpha)-deficient mice." *Brain Res.* 870.1-2 (2000): 10-19.
- Hepler, J. R., et al. "RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94.2 (1997): 428-32.
- Hepler, J. R. "Emerging roles for RGS proteins in cell signalling." *Trends Pharmacol.Sci.* 20.9 (1999): 376-82.
- Hepler, J. R., et al. "Novel activity of RGS14 on Galpha and Gialpha nucleotide binding and hydrolysis distinct from its RGS domain and GDI activity." *Biochemistry* 44.14 (2005): 5495-502.
- Herbert, J. M., et al. "Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C." *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 172.3 (1990): 993-99.
- Herkenham, M., et al. "Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study." *J.Neurosci.* 11.2 (1991): 563-83.
- Herrmann, C., et al. "Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor." *J.Biol.Chem.* 271.12 (1996): 6794-800.
- Herzberg, U., et al. "The analgesic effects of R(+)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain." *Neurosci.Lett.* 221.2-3 (1997): 157-60.
- Hillard, C. J., S. Muthian, and C. S. Keam. "Effects of CB(1) cannabinoid receptor activation on cerebellar granule cell nitric oxide synthase activity." *FEBS Lett.* 459.2 (1999): 277-81.
- Hinton, D. R., et al. "Novel localization of a G protein, Gz-alpha, in neurons of brain and retina." *J.Neurosci.* 10.8 (1990): 2763-70.
- Ho, M. K., L. Y. Yung, and Y. H. Wong. "Disruption of receptor-mediated activation of G protein by mutating a conserved arginine residue in the switch II region of the alpha subunit." *J.Neurochem.* 73.5 (1999): 2101-09.

- Hoffmeister, F. and Kronenberg, G. "Experimental studies in animals on the differentiation of analgesic activity." *Meth. Drug Ev.* (1966)
- Hohmann, A. G. and R. L. Suplita. "Endocannabinoid mechanisms of pain modulation." *AAPS.J.* 8.4 (2006): E693-E708.
- Hollinger, S., et al. "RGS14 is a bifunctional regulator of Galphai/o activity that exists in multiple populations in brain." *J.Neurochem.* 79.5 (2001): 941-49.
- Hollinger, S. and J. R. Hepler. "Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling." *Pharmacol.Rev.* 54.3 (2002): 527-59.
- Hollister, L. E. "Health aspects of cannabis." *Pharmacol.Rev.* 38.1 (1986): 1-20.
- Hooks, S. B., et al. "RGS6, RGS7, RGS9, and RGS11 stimulate GTPase activity of Gi family G-proteins with differential selectivity and maximal activity." *J.Biol.Chem.* 278.12 (2003): 10087-93.
- Howlett, A. C. "The cannabinoid receptors." *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69 (2002): 619-31.
- Hsieh, C., et al. "Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor." *J.Neurochem.* 73.2 (1999): 493-501.
- Hu, G. and T. G. Wensel. "R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase accelerating protein, RGS9-1." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99.15 (2002): 9755-60.
- Hu, X., et al. "Regulation of mouse kappa opioid receptor gene expression by different 3'-untranslated regions and the effect of retinoic acid." *Mol.Pharmacol.* 62.4 (2002): 881-87.
- Huang, C. C., et al. "Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression." *J.Biol.Chem.* 279.13 (2004): 12286-92.
- Huang, J., H. Wang, and V. M. Pickel. "Rostrocaudal variation in targeting of N-methyl-D-aspartate and mu-opioid receptors in the rat medial nucleus of the solitary tract." *J.Comp Neurol.* 421.3 (2000): 400-11.
- Hughes, J., et al. "Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor." *Life Sci.* 16.12 (1975): 1753-58.
- Huidobro, F. "Antidiuretic effect of morphine in the rat: tolerance and physical dependence." *Br.J.Pharmacol.* 64.2 (1978): 167-71.
- Humrich, J., et al. "Regulation of phosphocucinin-like protein by casein kinase 2 and N-terminal splicing." *J.Biol.Chem.* 278.7 (2003): 4474-81.
- Hunt, C. A., L. J. Schenker, and M. B. Kennedy. "PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses." *J.Neurosci.* 16.4 (1996): 1380-88.
- Husi, H., et al. "Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes." *Nat.Neurosci.* 3.7 (2000): 661-69.
- Ikeda, H., et al. "Effects of corticotropin-releasing factor on plasticity of optically recorded neuronal activity in the substantia gelatinosa of rat spinal cord slices." *Pain* 106.1-2 (2003): 197-207.
- Inoue, M., M. Mishina, and H. Ueda. "Locus-specific rescue of GluRepsilon1 NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence." *J.Neurosci.* 23.16 (2003): 6529-36.
- Izumi, Y., D. B. Clifford, and C. F. Zorumski. "Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release." *Science* 257.5074 (1992): 1273-76.
- Jacquet, Y. F. and A. Lajtha. "Morphine action at central nervous system sites in rat: analgesia or hyperalgesia depending on site and dose." *Science* 182.4111 (1973): 490-92.
- Javanmardi, K., et al. "Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in the rostral ventromedial medulla in modulating morphine pain-inhibitory signals from the periaqueductal grey matter in rats." *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 32.7 (2005): 585-89.
- Jensen, T. S. and T. L. Yaksh. "Comparison of the antinociceptive action of mu and delta opioid receptor ligands in the periaqueductal gray matter, medial and paramedial ventral medulla in the rat as studied by the microinjection technique." *Brain Res.* 372.2 (1986): 301-12.
- Jin, W., et al. "Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization." *J.Neurosci.* 19.10 (1999): 3773-80.
- Johnson, E. A., et al. "Agonist-selective mechanisms of mu-opioid receptor desensitization in human embryonic kidney 293 cells." *Mol.Pharmacol.* 70.2 (2006): 676-85.

- Jones, R. T., N. L. Benowitz, and R. I. Herning. "Clinical relevance of cannabis tolerance and dependence." *J.Clin.Pharmacol.* 21.8-9 Suppl (1981): 143S-52S.
- Jordan, J. D., et al. "Modulation of rap activity by direct interaction of Galpha(o) with Rap 1 GTPase-activating protein." *J.Biol.Chem.* 274.31 (1999): 21507-10.
- Kambe, Y., et al. "Induced tolerance to glutamate neurotoxicity through down-regulation of NR2 subunits of N-methyl-D-aspartate receptors in cultured rat striatal neurons." *J.Neurosci.Res.* (2010).
- Kathmann, M., et al. "Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of." *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 359.6 (1999): 466-70.
- Kato, K., S. T. Li, and C. F. Zorumski. "Modulation of long-term potentiation induction in the hippocampus by N-methyl-D-aspartate-mediated presynaptic inhibition." *Neuroscience* 92.4 (1999): 1261-72.
- Katona, I., et al. "Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GA BA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons." *J.Neurosci.* 19.11 (1999): 4544-58.
- Kazanietz, M. G., et al. "Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis." *J.Biol.Chem.* 270.37 (1995): 21852-59.
- Keith, D. E., et al. "Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization." *J.Biol.Chem.* 271.32 (1996): 19021-24.
- Keith, D. E., et al. "mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain." *Mol.Pharmacol.* 53.3 (1998): 377-84.
- Kelso, S. R., T. E. Nelson, and J. P. Leonard. "Protein kinase C-mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in *Xenopus* oocytes." *J.Physiol* 449 (1992): 705-18.
- Keresztes, G., et al. "Absence of the RGS9.Gbeta5 GTPase-activating complex in photoreceptors of the R9AP knockout mouse." *J.Biol.Chem.* 279.3 (2004): 1581-84.
- Kiedrowski, L., E. Costa, and J. T. Wroblewski. "Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells." *J.Neurochem.* 58.1 (1992): 335-41.
- Kieffer, B. L., et al. "The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89.24 (1992): 12048-52.
- Kiel, C., et al. "Recognizing and defining true Ras binding domains II: in silico prediction based on homology modelling and energy calculations." *J.Mol.Biol.* 348.3 (2005): 759-75.
- Kim, C. H., et al. "Persistent hippocampal CA1 LTP in mice lacking the C-terminal PDZ ligand of GluR1." *Nat.Neurosci.* 8.8 (2005): 985-87.
- Kim, D. Y., et al. "High abundance of GluR1 mRNA and reduced Q/R editing of GluR2 mRNA in individual NADPH-diaphorase neurons." *Mol.Cell Neurosci.* 17.6 (2001): 1025-33.
- Kim, J. H., et al. "SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family." *Neuron* 20.4 (1998): 683-91.
- Kimple, R. J., et al. "RGS12 and RGS14 GoLoco motifs are G alpha(i) interaction sites with guanine nucleotide dissociation inhibitor Activity." *J.Biol.Chem.* 276.31 (2001): 29275-81.
- Kimple, R. J., et al. "Structural determinants for GoLoco-induced inhibition of nucleotide release by Galpha subunits." *Nature* 416.6883 (2002): 878-81.
- Kissin, I., P. T. Brown, and E. L. Bradley, Jr. "Magnitude of acute tolerance to opioids is not related to their potency." *Anesthesiology* 75.5 (1991): 813-16.
- Kitayama, H., et al. "A ras-related gene with transformation suppressor activity." *Cell* 56.1 (1989): 77-84.
- Klein, T. W., C. Newton, and H. Friedman. "Cannabinoid receptors and immunity." *Immunol.Today* 19.8 (1998): 373-81.
- Kleuss, C., et al. "Different beta-subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors." *Nature* 358.6385 (1992): 424-26.
- Kleuss, C., et al. "Selectivity in signal transduction determined by gamma subunits of heterotrimeric G proteins." *Science* 259.5096 (1993): 832-34.
- Klinz, F. J., et al. "Generation of specific antibodies against the rap1A, rap1B and rap2 small GTP-binding proteins. Analysis of rap and ras proteins in membranes from mammalian cells." *Eur.J.Biochem.* 207.1 (1992): 207-13.

- Koch, T., et al. "C-terminal splice variants of the mouse mu-opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization." *J.Biol.Chem.* 276.33 (2001): 31408-14.
- Koch, T., et al. "Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance." *Mol.Pharmacol.* 67.1 (2005): 280-87.
- Koch, W. J., et al. "Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by Gbeta gamma activation of p21ras." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91.26 (1994): 12706-10.
- Kolesnikov, Y. A., et al. "Blockade of tolerance to morphine but not to kappa opioids by a nitric oxide synthase inhibitor." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90.11 (1993): 5162-66.
- Komiyama, N. H., et al. "SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor." *J.Neurosci.* 22.22 (2002): 9721-32.
- Kornau, H. C., et al. "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95." *Science* 269.5231 (1995): 1737-40.
- Kosterlitz, H. W. and J. Hughes. "Some thoughts on the significance of enkephalin, the endogenous ligand." *Life Sci.* 17.1 (1975): 91-96.
- Kouznetsova, M., et al. "Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between rat hippocampal neurons in culture." *Mol.Pharmacol.* 61.3 (2002): 477-85.
- Kow, L. M., et al. "Potentiation of the excitatory action of NMDA in ventrolateral periaqueductal gray by the mu-opioid receptor agonist, DAMGO." *Brain Res.* 935.1-2 (2002): 87-102.
- Krapivinsky, G., et al. "The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and Ras GRF1." *Neuron* 40.4 (2003): 775-84.
- Krapivinsky, G., et al. "SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation." *Neuron* 43.4 (2004): 563-74.
- Krasel, C., et al. "Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin." *J.Biol.Chem.* 276.3 (2001): 1911-15.
- Krispel, C. M., et al. "RGS expression rate-limits recovery of rod photoresponses." *Neuron* 51.4 (2006): 409-16.
- Krupnick, J. G. and J. L. Benovic. "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation." *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 38 (1998): 289-319.
- Krupp, J. J., et al. "Calcineurin acts via the C-terminus of NR2A to modulate desensitization of NMDA receptors." *Neuropharmacology* 42.5 (2002): 593-602.
- Kuhar, M. J., C. B. Pert, and S. H. Snyder. "Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain." *Nature* 245.5426 (1973): 447-50.
- Kyosseva, S. V. "Mitogen-activated protein kinase signaling." *Int.Rev.Neurobiol.* 59 (2004): 201-20.
- Lander, H. M., P. K. Sehajpal, and A. Novogrodsky. "Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins." *J.Immunol.* 151.12 (1993): 7182-87.
- Lander, H. M., et al. "Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species." *J.Biol.Chem.* 271.33 (1996): 19705-09.
- Lander, H. M., et al. "A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction." *J.Biol.Chem.* 272.7 (1997): 4323-26.
- Lauckner, J. E., B. Hille, and K. Mackie. "The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102.52 (2005): 19144-49.
- Leck, K. J., et al. "Deletion of guanine nucleotide binding protein alpha z subunit in mice induces a gene dose dependent tolerance to morphine." *Neuropharmacology* 46.6 (2004): 836-46.
- Lee, C. J., et al. "Functional expression of AMPA receptors on central terminals of rat dorsal root ganglion neurons and presynaptic inhibition of glutamate release." *Neuron* 35.1 (2002): 135-46.
- Lee, R. H., B. M. Brown, and R. N. Lolley. "Protein kinase A phosphorylates retinal phosphodiesterase on serine 73 in situ." *J.Biol.Chem.* 265.26 (1990): 15860-66.
- Lefkowitz, R. J. "G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization." *J.Biol.Chem.* 273.30 (1998): 18677-80.
- Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy. "Transduction of receptor signals by beta-arrestins." *Science* 308.5721 (2005): 512-17.

- Leonard, A. S. and J. W. Hell. "Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites." *J.Biol.Chem.* 272.18 (1997): 12107-15.
- Leonard, A. S., et al. "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96.6 (1999): 3239-44.
- Leterrier, C., et al. "Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor." *J.Biol.Chem.* 279.34 (2004): 36013-21.
- Lev, S., et al. "Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions." *Nature* 376.6543 (1995): 737-45.
- Levy, K., et al. "Localization of the sites for Ca²⁺-binding proteins on G protein-coupled receptor kinases." *Biochemistry* 37.39 (1998): 13650-59.
- Li, L. Y. and K. J. Chang. "The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors." *Mol.Pharmacol.* 50.3 (1996): 599-602.
- Li, S., et al. "The environment versus genetics in controlling the contribution of MAP kinases to synaptic plasticity." *Curr.Biol.* 16.23 (2006): 2303-13.
- Li, Y., et al. "Rap1a null mice have altered myeloid cell functions suggesting distinct roles for the closely related Rap1a and 1b proteins." *J.Immunol.* 179.12 (2007): 8322-31.
- Lichtman, A. H., S. A. Cook, and B. R. Martin. "Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 276.2 (1996): 585-93.
- Lima, C. D., et al. "Three-dimensional structure of human protein kinase C interacting protein 1, a member of the HIT family of proteins." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93.11 (1996): 5357-62.
- Lima, C. D., M. G. Klein, and W. A. Hendrickson. "Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family." *Science* 278.5336 (1997): 286-90.
- Linder, M. E., et al. "Lipid modifications of G proteins: alpha subunits are palmitoylated." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90.8 (1993): 3675-79.
- Lisman, J., et al. "Learning mechanisms: the case for CaM-KII." *Science* 276.5321 (1997): 2001-02.
- Lisman, J., H. Schulman, and H. Cline. "The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory." *Nat.Rev.Neurosci.* 3.3 (2002): 175-90.
- Liu-Chen, L. Y., C. Chen, and C. A. Phillips. "Beta-[3H]funtrexamine-labeled mu-opioid receptors: species variations in molecular mass and glycosylation by complex-type, N-linked oligosaccharides." *Mol.Pharmacol.* 44.4 (1993): 749-56.
- Liu, L., et al. "Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity." *Science* 304.5673 (2004): 1021-24.
- Llansola, M., P. Monfort, and V. Felipo. "Inhibitors of phospholipase C prevent glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 292.3 (2000): 870-76.
- Lodowski, D. T., et al. "Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma." *Science* 300.5623 (2003): 1256-62.
- Longenecker, K. L., et al. "Structure of the RGS-like domain from PDZ-RhoGEF: linking heterotrimeric G protein-coupled signaling to Rho GTPases." *Structure.* 9.7 (2001): 559-69.
- Lopez-Fando, A., et al. "Expression of neural RGS-R7 and Gbeta5 Proteins in Response to Acute and Chronic Morphine." *Neuropsychopharmacology* 30.1 (2005): 99-110.
- Lopez-Illasaca, M., et al. "Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma." *Science* 275.5298 (1997): 394-97.
- Lord, J. A., et al. "Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors." *Nature* 267.5611 (1977): 495-99.
- Lou, X., et al. "GIPC and GAIP form a complex with TrkA: a putative link between G protein and receptor tyrosine kinase pathways." *Mol.Biol.Cell* 12.3 (2001): 615-27.
- Lowry, O. H., et al. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J.Biol.Chem.* 193.1 (1951): 265-75.
- Lu, L., et al. "Inhibition of the amygdala and hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II attenuates the dependence and relapse to morphine differently in rats." *Neurosci.Lett.* 291.3 (2000): 191-95.

- Lu, W. Y., et al. "G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors." *Nat.Neurosci.* 2.4 (1999): 331-38.
- Lu, X., Y. Rong, and M. Baudry. "Calpain-mediated degradation of PSD-95 in developing and adult rat brain." *Neurosci.Lett.* 286.2 (2000): 149-53.
- Luscher, C., et al. "Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane." *Nat.Neurosci.* 3.6 (2000): 545-50.
- Luttrell, L. M., Y. Daaka, and R. J. Lefkowitz. "Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors." *Curr.Opin.Cell Biol.* 11.2 (1999): 177-83.
- Lynch, D. R. and S. H. Snyder. "Neuropeptides: multiple molecular forms, metabolic pathways, and receptors." *Annu.Rev.Biochem.* 55 (1986): 773-99.
- Ma, Y. C., et al. "Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins." *Cell* 102.5 (2000): 635-46.
- Mackie, K. and B. Hille. "Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89.9 (1992): 3825-29.
- Mackie, K. "Cannabinoid receptors as therapeutic targets." *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 46 (2006): 101-22.
- Maldonado, R. and O. Valverde. "Participation of the opioid system in cannabinoid-induced antinociception and emotional-like responses." *Eur.Neuropsychopharmacol.* 13.6 (2003): 401-10.
- Malenka, R. C. and R. A. Nicoll. "Long-term potentiation--a decade of progress?" *Science* 285.5435 (1999): 1870-74.
- Malenka, R. C. and M. F. Bear. "LTP and LTD: an embarrassment of riches." *Neuron* 44.1 (2004): 5-21.
- Malinow, R., Z. F. Mainen, and Y. Hayashi. "LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic." *Curr.Opin.Neurobiol.* 10.3 (2000): 352-57.
- Malinow, R. and R. C. Malenka. "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." *Annu.Rev.Neurosci.* 25 (2002): 103-26.
- Malmberg, A. B., et al. "Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ ." *Science* 278.5336 (1997): 279-83.
- Man, H. Y., et al. "Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons." *Neuron* 38.4 (2003): 611-24.
- Mansour, A., et al. "Anatomy of CNS opioid receptors." *Trends Neurosci.* 11.7 (1988): 308-14.
- Mao, H., et al. "RGS17/RGSZ2, a novel regulator of Gi/o, Gz, and Gq signaling." *J.Biol.Chem.* 279.25 (2004): 26314-22.
- Mao, J., et al. "Antinociceptive tolerance to the mu-opioid agonist DAMGO is dose-dependently reduced by MK-801 in rats." *Neurosci.Lett.* 250.3 (1998): 193-96.
- Mao, J., et al. "Two distinctive antinociceptive systems in rats with pathological pain." *Neurosci.Lett.* 280.1 (2000): 13-16.
- Marais, R., et al. "Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation." *EMBO J.* 14.13 (1995): 3136-45.
- Marais, R., et al. "Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases." *J.Biol.Chem.* 272.7 (1997): 4378-83.
- Marek, P., et al. "Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat." *Brain Res.* 547.1 (1991): 77-81.
- Marie, N., B. Aguila, and S. Allouche. "Tracking the opioid receptors on the way of desensitization." *Cell Signal.* 18.11 (2006): 1815-33.
- Mariggio, S., et al. "Tyrosine phosphorylation of G-protein-coupled-receptor kinase 2 (GRK2) by c-Src modulates its interaction with Galphaq." *Cell Signal.* 18.11 (2006): 2004-12.
- Marsicano, G., et al. "CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity." *Science* 302.5642 (2003): 84-88.
- Martemyanov, K. A., et al. "R7BP, a novel neuronal protein interacting with RGS proteins of the R7 family." *J.Biol.Chem.* 280.7 (2005): 5133-36.
- Martin-McCaffrey, L., et al. "RGS14 is a mitotic spindle protein essential from the first division of the mammalian zygote." *Dev.Cell* 7.5 (2004): 763-69.

- Martin, B. R., S. P. Welch, and M. Abood. "Progress toward understanding the cannabinoid receptor and its second messenger systems." *Adv.Pharmacol.* 25 (1994): 341-97.
- Martini, L., et al. "Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1." *FASEB J.* 21.3 (2007): 802-11.
- Massey, P. V., et al. "Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression." *J.Neurosci.* 24.36 (2004): 7821-28.
- Massotte, D., et al. "Agonists activate Gi1 alpha or Gi2 alpha fused to the human mu opioid receptor differently." *J.Neurochem.* 81.6 (2002): 1372-82.
- Matsuda, L. A., et al. "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." *Nature* 346.6284 (1990): 561-64.
- Mayer, D. J. and J. C. Liebeskind. "Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis." *Brain Res.* 68.1 (1974): 73-93.
- Mayer, P., et al. "Promoter region and alternatively spliced exons of the rat mu-opioid receptor gene." *J.Neurochem.* 66.6 (1996): 2272-78.
- McDonald, J. R., U. Groschel-Stewart, and M. P. Walsh. "Properties and distribution of the protein inhibitor (Mr 17,000) of protein kinase C." *Biochem.J.* 242.3 (1987): 695-705.
- McIntosh, B. T., et al. "Agonist-dependent cannabinoid receptor signalling in human trabecular meshwork cells." *Br.J.Pharmacol.* 152.7 (2007): 1111-20.
- McLaughlin, J. N., et al. "Regulation of angiotensin II-induced G protein signaling by phosphatidylinositol-3-OH kinase-like protein." *J.Biol.Chem.* 277.38 (2002): 34885-95.
- McLaughlin, J. P. and C. Chavkin. "Tyrosine phosphorylation of the mu-opioid receptor regulates agonist intrinsic efficacy." *Mol.Pharmacol.* 59.6 (2001): 1360-68.
- McLeod, S. J., et al. "The Rap GTPases regulate integrin-mediated adhesion, cell spreading, actin polymerization, and Pyk2 tyrosine phosphorylation in B lymphocytes." *J.Biol.Chem.* 279.13 (2004): 12009-19.
- Mechoulam, R., et al. "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors." *Biochem.Pharmacol.* 50.1 (1995): 83-90.
- Meng, I. D., et al. "An analgesia circuit activated by cannabinoids." *Nature* 395.6700 (1998): 381-83.
- Meng, J., et al. "Functional interaction between Gα(z) and Rap1GAP suggests a novel form of cellular cross-talk." *J.Biol.Chem.* 274.51 (1999): 36663-69.
- Miles, M. F., et al. "Phosphatidylinositol-3-OH kinase-like protein: an ethanol-responsive potential modulator of guanine nucleotide-binding protein function." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90.22 (1993): 10831-35.
- Minger, S. L., et al. "Glutamate receptor antagonists inhibit calpain-mediated cytoskeletal proteolysis in focal cerebral ischemia." *Brain Res.* 810.1-2 (1998): 181-99.
- Mittal, V. and M. E. Linder. "The RGS14 GoLoco domain discriminates among Gα_i isoforms." *J.Biol.Chem.* 279.45 (2004): 46772-78.
- Mittal, V. and M. E. Linder. "Biochemical characterization of RGS14: RGS14 activity towards G-protein alpha subunits is independent of its binding to Rap2A." *Biochem.J.* 394.Pt 1 (2006): 309-15.
- Mochizuki, N., et al. "Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with Gα_i." *Nature* 400.6747 (1999): 891-94.
- Moore, T. H., et al. "Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review." *Lancet* 370.9584 (2007): 319-28.
- Mori, H. and M. Mishina. "Structure and function of the NMDA receptor channel." *Neuropharmacology* 34.10 (1995): 1219-37.
- Morice, C., et al. "Raf-1 and B-Raf proteins have similar regional distributions but differential subcellular localization in adult rat brain." *Eur.J.Neurosci.* 11.6 (1999): 1995-2006.
- Morrison, D. K. and R. E. Cutler. "The complexity of Raf-1 regulation." *Curr.Opin.Cell Biol.* 9.2 (1997): 174-79.
- Mumby, S. M., et al. "G-protein alpha-subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87.2 (1990): 728-32.
- Munro, S., K. L. Thomas, and M. Abu-Shaar. "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." *Nature* 365.6441 (1993): 61-65.

- Nagayama, T., et al. "Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures." *J.Neurosci.* 19.8 (1999): 2987-95.
- Nahas, G. G., D. J. Harvey, and K. M. Sutin. "Psychoactive cannabinoids and membrane signaling." *Hum.Psychopharmacol.* 15.7 (2000): 535-49.
- Nakazi, M., et al. "Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors." *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 361.1 (2000): 19-24.
- Narita, M., et al. "Influence of chronic morphine treatment on protein kinase C activity: comparison with butorphanol and implication for opioid tolerance." *Brain Res.* 650.1 (1994): 175-79.
- Narita, M., et al. "Involvement of protein kinase Cgamma isoform in morphine-induced reinforcing effects." *Neuroscience* 103.2 (2001): 309-14.
- Narita, M., et al. "Treatment for psychological dependence on morphine: usefulness of inhibiting NMDA receptor and its associated protein kinase in the nucleus accumbens." *Life Sci.* 77.18 (2005): 2207-20.
- Neer, E. J. "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals." *Cell* 80.2 (1995): 249-57.
- Nestler, E. J. "Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction." *Nat.Rev.Neurosci.* 2.2 (2001): 119-28.
- Nestler, E. J. "Molecular mechanisms of drug addiction." *Neuropharmacology* 47 Suppl 1 (2004): 24-32.
- New, D. C., et al. "G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis." *FEBS J.* 274.23 (2007): 6025-36.
- Newton, A. C. "Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions." *Chem.Rev.* 101.8 (2001): 2353-64.
- Nishiguchi, K. M., et al. "Defects in RGS9 or its anchor protein R9AP in patients with slow photoreceptor deactivation." *Nature* 427.6969 (2004): 75-78.
- Nishizuka, Y. "Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses." *FASEB J.* 9.7 (1995): 484-96.
- Nong, Y., Y. Q. Huang, and M. W. Salter. "NMDA receptors are movin' in." *Curr.Opin.Neurobiol.* 14.3 (2004): 353-61.
- Nott, M. W. "Potentiation of morphine analgesia by cocaine in mice." *Eur.J.Pharmacol.* 5.1 (1968): 93-99.
- Oberdorf, A., F. Hoffmeister, and G. Kroneberg. "[On the mechanism of action of new drugs effective upon the autonomic and central nervous system]." *Naunyn Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.* 257.1 (1967): 48-49.
- Oh, J. S., P. Manzerra, and M. B. Kennedy. "Regulation of the neuron-specific Ras GTPase-activating protein, synGAP, by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." *J.Biol.Chem.* 279.17 (2004): 17980-88.
- Ohba, Y., et al. "Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade." *Mol.Cell Biol.* 20.16 (2000): 6074-83.
- Okada, T., et al. "The strength of interaction at the Raf cysteine-rich domain is a critical determinant of response of Raf to Ras family small GTPases." *Mol.Cell Biol.* 19.9 (1999): 6057-64.
- Oldham, W. M. and H. E. Hamm. "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9.1 (2008): 60-71.
- Omkuar, R. V., et al. "Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor." *J.Biol.Chem.* 271.49 (1996): 31670-78.
- Ortiz, J., et al. "Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine." *J.Neurosci.* 15.2 (1995): 1285-97.
- Otmakhov, N., et al. "Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation." *J.Neurosci.* 24.42 (2004): 9324-31.
- Oviedo, A., J. Glowa, and M. Herkenham. "Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study." *Brain Res.* 616.1-2 (1993): 293-302.
- Paganini, S., et al. "Identification and biochemical characterization of Rap2C, a new member of the Rap family of small GTP-binding proteins." *Biochimie* 88.3-4 (2006): 285-95.
- Pak, D. T., et al. "Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP." *Neuron* 31.2 (2001): 289-303.

- Pan, Y. X., et al. "Identification and characterization of three new alternatively spliced mu-opioid receptor isoforms." *Mol.Pharmacol.* 56.2 (1999): 396-403.
- Pan, Y. X., et al. "Generation of the mu opioid receptor (MOR-1) protein by three new splice variants of the Oprm gene." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98.24 (2001): 14084-89.
- Pan, Y. X., et al. "Identification and characterization of two new human mu opioid receptor splice variants, hMOR-1O and hMOR-1X." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 301.4 (2003): 1057-61.
- Panikashvili, D., et al. "An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury." *Nature* 413.6855 (2001): 527-31.
- Panikashvili, D., et al. "CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition." *J.Cereb.Blood Flow Metab* 25.4 (2005): 477-84.
- Parmentier-Batteur, S., et al. "Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice." *J.Neurosci.* 22.22 (2002): 9771-75.
- Partridge, J. G., H. L. Puhl, III, and S. R. Ikeda. "Phosducin and phosducin-like protein attenuate G-protein-coupled receptor-mediated inhibition of voltage-gated calcium channels in rat sympathetic neurons." *Mol.Pharmacol.* 70.1 (2006): 90-100.
- Passafaro, M., V. Piech, and M. Sheng. "Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons." *Nat.Neurosci.* 4.9 (2001): 917-26.
- Pasternak, D. A., et al. "Identification of three new alternatively spliced variants of the rat mu opioid receptor gene: dissociation of affinity and efficacy." *J.Neurochem.* 91.4 (2004): 881-90.
- Pasternak, G. W., R. Simantov, and S. H. Snyder. "Characterization of an endogenous morphine-like factor(enkephalin) in mammalian brain." *Mol.Pharmacol.* 12.3 (1976): 504-13.
- Pasternak, G. W., Y. A. Kolesnikov, and A. M. Babey. "Perspectives on the N-methyl-D-aspartate/nitric oxide cascade and opioid tolerance." *Neuropsychopharmacology* 13.4 (1995): 309-13.
- Pasternak, G. W. "Incomplete cross tolerance and multiple mu opioid peptide receptors." *Trends Pharmacol.Sci.* 22.2 (2001): 67-70.
- Pasternak, G. W. "Molecular biology of opioid analgesia." *J.Pain Symptom.Manage.* 29.5 Suppl (2005): S2-S9.
- Pearson, J. D., et al. "Amino acid sequence and characterization of a protein inhibitor of protein kinase C." *J.Biol.Chem.* 265.8 (1990): 4583-91.
- Pena, V., et al. "The C2 domain of SynGAP is essential for stimulation of the Rap GTPase reaction." *EMBO Rep.* 9.4 (2008): 350-55.
- Penela, P., et al. "Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway." *J.Biol.Chem.* 273.52 (1998): 35238-44.
- Pernia-Andrade, A. J., et al. "Spinal endocannabinoids and CB1 receptors mediate C-fiber-induced heterosynaptic pain sensitization." *Science* 325.5941 (2009): 760-64.
- Pert, A. and T. Yaksh. "Sites of morphine induced analgesia in the primate brain: relation to pain pathways." *Brain Res.* 80.1 (1974): 135-40.
- Pert, C. B., G. Pasternak, and S. H. Snyder. "Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain." *Science* 182.119 (1973): 1359-61.
- Pert, C. B. and S. H. Snyder. "Properties of opiate-receptor binding in rat brain." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 70.8 (1973a): 2243-47.
- Pert, C. B. and S. H. Snyder. "Opiate receptor: demonstration in nervous tissue." *Science* 179.77 (1973b): 1011-14.
- Pertwee, R. "The evidence for the existence of cannabinoid receptors." *Gen.Pharmacol.* 24.4 (1993): 811-24.
- Pertwee, R. G. "Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors." *Pharmacol.Ther.* 74.2 (1997): 129-80.
- Pertwee, R. G. "Pharmacology of cannabinoid receptor ligands." *Curr.Med.Chem.* 6.8 (1999): 635-64.
- Pettit, D. A., et al. "Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain." *J.Neurosci.Res.* 51.3 (1998): 391-402.
- Pineyro, G. and E. Archer-Lahlou. "Ligand-specific receptor states: implications for opiate receptor signalling and regulation." *Cell Signal.* 19.1 (2007): 8-19.
- Pitcher, J. A., et al. "The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin." *J.Biol.Chem.* 273.20 (1998): 12316-24.

- Polakiewicz, R. D., et al. "A mitogen-activated protein kinase pathway is required for mu-opioid receptor desensitization." *J.Biol.Chem.* 273.20 (1998): 12402-06.
- Popov, S., et al. "The regulators of G protein signaling (RGS) domains of RGS4, RGS10, and GAIP retain GTPase activating protein activity in vitro." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94.14 (1997): 7216-20.
- Posner, B. A., A. G. Gilman, and B. A. Harris. "Regulators of G protein signaling 6 and 7. Purification of complexes with gbeta5 and assessment of their effects on g protein-mediated signaling pathways." *J.Biol.Chem.* 274.43 (1999): 31087-93.
- Raffa, R. B., D. J. Stone, Jr., and S. J. Hipp. "Differential cholera-toxin sensitivity of supraspinal antinociception induced by the cannabinoid agonists delta9-THC, WIN 55,212-2 and anandamide in mice." *Neurosci.Lett.* 263.1 (1999): 29-32.
- Rahman, Z., et al. "Cloning and characterization of RGS9-2: a striatal-enriched alternatively spliced product of the RGS9 gene." *J.Neurosci.* 19.6 (1999): 2016-26.
- Rama, S., et al. "The MUPP1-SynGAPalpha protein complex does not mediate activity-induced LTP." *Mol.Cell Neurosci.* 38.2 (2008): 183-88.
- Raveendran, R., et al. "Phosphorylation status of the NR2B subunit of NMDA receptor regulates its interaction with calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." *J.Neurochem.* 110.1 (2009): 92-105.
- Ribas, C., et al. "The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling." *Biochim.Biophys.Acta* 1768.4 (2007): 913-22.
- Richardson, J. D., S. Kilo, and K. M. Hargreaves. "Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors." *Pain* 75.1 (1998): 111-19.
- Rinaldi-Carmona, M., et al. "Modulation of CB1 cannabinoid receptor functions after a long-term exposure to agonist or inverse agonist in the Chinese hamster ovary cell expression system." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 287.3 (1998): 1038-47.
- Rios, C., I. Gomes, and L. A. Devi. "mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis." *Br.J.Pharmacol.* 148.4 (2006): 387-95.
- Robbins, T. W. and B. J. Everitt. "Limbic-striatal memory systems and drug addiction." *Neurobiol.Learn.Mem.* 78.3 (2002): 625-36.
- Robillard, L., et al. "Gbetagamma subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling in vivo." *Cell Signal.* 12.9-10 (2000): 673-82.
- Roche, K. W., et al. "Molecular determinants of NMDA receptor internalization." *Nat.Neurosci.* 4.8 (2001): 794-802.
- Rodriguez-Munoz, M., et al. "Sumoylated RGS-Rz proteins act as scaffolds for Mu-opioid receptors and G-protein complexes in mouse brain." *Neuropsychopharmacology* 32.4 (2007): 842-50.
- Rodriguez de, Fonseca F., et al. "Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement." *Life Sci.* 54.3 (1994): 159-70.
- Rose, J. J., et al. "RGS7 is palmitoylated and exists as biochemically distinct forms." *J.Neurochem.* 75.5 (2000): 2103-12.
- Ross, E. M. and T. M. Wilkie. "GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins." *Annu.Rev.Biochem.* 69 (2000): 795-827.
- Rossi, G. C., et al. "Antisense mapping the MOR-1 opioid receptor: evidence for alternative splicing and a novel morphine-6 beta-glucuronide receptor." *FEBS Lett.* 369.2-3 (1995): 192-96.
- Rostas, J. A., et al. "Enhanced tyrosine phosphorylation of the 2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor in long-term potentiation." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93.19 (1996): 10452-56.
- Sagan, S., et al. "Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes." *Eur.J.Neurosci.* 11.2 (1999): 691-99.
- Saito, N. and Y. Shirai. "Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype." *J.Biochem.* 132.5 (2002): 683-87.
- Saitoh, O., et al. "RGS7 and RGS8 differentially accelerate G protein-mediated modulation of K+ currents." *J.Biol.Chem.* 274.14 (1999): 9899-904.
- Sallese, M., et al. "Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq." *Mol.Pharmacol.* 57.4 (2000): 826-31.

- Sanchez-Blazquez, P. and J. Garzon. "Evaluation of delta receptor mediation of supraspinal opioid analgesia by in vivo protection against the beta-funaltrexamine antagonist effect." *Eur.J.Pharmacol.* 159.1 (1989): 9-23.
- Sanchez-Blazquez, P., et al. "Gx/z and Gi2 transducer proteins on mu/delta opioid-mediated supraspinal antinociception." *Life Sci.* 53.23 (1993): L381-L386.
- Sanchez-Blazquez, P., A. Garcia-Espana, and J. Garzon. "In vivo injection of antisense oligodeoxynucleotides to G alpha subunits and supraspinal analgesia evoked by mu and delta opioid agonists." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 275.3 (1995): 1590-96.
- Sanchez-Blazquez, P., A. Garcia-Espana, and J. Garzon. "Antisense oligodeoxynucleotides to opioid mu and delta receptors reduced morphine dependence in mice: role of delta-2 opioid receptors." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 280.3 (1997): 1423-31.
- Sanchez-Blazquez, P. and J. Garzon. "delta Opioid receptor subtypes activate inositol-signaling pathways in the production of antinociception." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 285.2 (1998): 820-27.
- Sanchez-Blazquez, P., P. Gomez-Serranillos, and J. Garzon. "Agonists determine the pattern of G-protein activation in mu-opioid receptor-mediated supraspinal analgesia." *Brain Res.Bull.* 54.2 (2001): 229-35.
- Sanchez-Blazquez, P., et al. "The GBeta5 subunit that associates with the R7 subfamily of RGS proteins regulates mu-opioid effects." *Neuropharmacology* 45.1 (2003): 82-95.
- Sanchez-Blazquez, P., et al. "Exogenous myristoylated-G(i2)alpha subunits of GTP-binding proteins are mitogens following their internalization by astrocytes in culture." *Brain Res.Mol.Brain Res.* 110.1 (2003): 15-26.
- Sanchez-Blazquez, P., et al. "RGS-Rz and RGS9-2 proteins control mu-opioid receptor desensitisation in CNS: the role of activated Galphaz subunits." *Neuropharmacology* 48.1 (2005): 134-50.
- Sánchez-Blázquez, P., et al. "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II supports morphine antinociceptive tolerance by phosphorylation of glycosylated phosducin-like protein." *Neuropharmacology* 54(2) (2008): 319-330
- Sanchez-Blazquez, P., et al. "Brain-specific Galphaz interacts with Src tyrosine kinase to regulate Mu-opioid receptor-NMDAR signaling pathway." *Cell Signal.* 21.9 (2009): 1444-54.
- Sarnago, S., A. Elorza, and F. Mayor, Jr. "Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase." *J.Biol.Chem.* 274.48 (1999): 34411-16.
- Sawada, Y., et al. "Rap1 is involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase." *J.Cell Sci.* 114.Pt 6 (2001): 1221-27.
- Scannevin, R. H. and R. L. Huganir. "Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses." *Nat.Rev.Neurosci.* 1.2 (2000): 133-41.
- Scavone, J. L., K. Mackie, and E. J. van Bockstaele. "Characterization of cannabinoid-1 receptors in the locus coeruleus: relationship with mu-opioid receptors." *Brain Res.* 1312 (2010): 18-31.
- Schatz, A. R., et al. "Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system." *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 142.2 (1997): 278-87.
- Schlicker, E., et al. "Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus." *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 356.5 (1997): 583-89.
- Schlicker, E. and M. Kathmann. "Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors." *Trends Pharmacol.Sci.* 22.11 (2001): 565-72.
- Schmidt, H., et al. "Involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the mu-opioid receptor in HEK 293 cells." *J.Neurochem.* 74.1 (2000): 414-22.
- Schmidt, M., et al. "Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes." *J.Biol.Chem.* 275.52 (2000): 41011-17.
- Schonwasser, D. C., et al. "Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms." *Mol.Cell Biol.* 18.2 (1998): 790-98.
- Schroder, S., et al. "Identification of a C-terminal binding site for G-protein betagamma-subunits in phosducin-like protein." *FEBS Lett.* 401.2-3 (1997): 243-46.
- Schulman, H., P. I. Hanson, and T. Meyer. "Decoding calcium signals by multifunctional CaM kinase." *Cell Calcium* 13.6-7 (1992): 401-11.

- Schulz, K., et al. "Expression of phosducin in a phosducin-negative cell line reveals functions of a Gbetagamma-binding protein." *J.Biol.Chem.* 271.37 (1996): 22546-51.
- Schulz, R., D. A. Eisinger, and A. Wehmeyer. "Opioid control of MAP kinase cascade." *Eur.J.Pharmacol.* 500.1-3 (2004): 487-97.
- Schulz, S., et al. "Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375." *EMBO J.* 23.16 (2004): 3282-89.
- Schwindinger, W. F. and J. D. Robishaw. "Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation." *Oncogene* 20.13 (2001): 1653-60.
- Shahrestanifar, M., W. W. Wang, and R. D. Howells. "Studies on inhibition of mu and delta opioid receptor binding by dithiothreitol and N-ethylmaleimide. His223 is critical for mu opioid receptor binding and inactivation by N-ethylmaleimide." *J.Biol.Chem.* 271.10 (1996): 5505-12.
- Shen, K. and T. Meyer. "Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation." *Science* 284.5411 (1999): 162-66.
- Shen, M. and S. A. Thayer. "Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity." *Mol.Pharmacol.* 54.3 (1998): 459-62.
- Sheng, M. and S. H. Lee. "AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission." *Cell* 105.7 (2001): 825-28.
- Shi, J., et al. "Developmental depression of glutamate neurotransmission by chronic low-level activation of NMDA receptors." *J.Neurosci.* 21.16 (2001): 6233-44.
- Shim, J. Y., W. J. Welsh, and A. C. Howlett. "Homology model of the CB1 cannabinoid receptor: sites critical for nonclassical cannabinoid agonist interaction." *Biopolymers* 71.2 (2003): 169-89.
- Shimohama, S., et al. "Glutamate-induced antigenic changes of phospholipase C-delta in cultured cortical neurons." *J.Neurosci.Res.* 41.3 (1995): 418-26.
- Shu, F. J., et al. "Selective interactions between Gi alpha1 and Gi alpha3 and the GoLoco/GPR domain of RGS14 influence its dynamic subcellular localization." *Cell Signal.* 19.1 (2007): 163-76.
- Shu, F. J., S. Ramineni, and J. R. Hepler. "RGS14 is a multifunctional scaffold that integrates G protein and Ras/Raf MAPkinase signalling pathways." *Cell Signal.* 22.3 (2010): 366-76.
- Shuey, D. J., et al. "RGS7 attenuates signal transduction through the G(alpha q) family of heterotrimeric G proteins in mammalian cells." *J.Neurochem.* 70.5 (1998): 1964-72.
- Sierra, D. A., et al. "Evolution of the regulators of G-protein signaling multigene family in mouse and human." *Genomics* 79.2 (2002): 177-85.
- Sim-Selley, L. J. and B. R. Martin. "Effect of chronic administration of R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl)methanone mesylate (WIN55,212-2) or delta(9)-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor adaptation in mice." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 303.1 (2002): 36-44.
- Sim-Selley, L. J. "Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids." *Crit Rev.Neurobiol.* 15.2 (2003): 91-119.
- Sim-Selley, L. J., et al. "Prolonged recovery rate of CB1 receptor adaptation after cessation of long-term cannabinoid administration." *Mol.Pharmacol.* 70.3 (2006): 986-96.
- Sim, L. J., et al. "Differences in G-protein activation by mu- and delta-opioid, and cannabinoid, receptors in rat striatum." *Eur.J.Pharmacol.* 307.1 (1996): 97-105.
- Siman, R., M. Baudry, and G. Lynch. "Purification from synaptosomal plasma membranes of calpain I, a thiol protease activated by micromolar calcium concentrations." *J.Neurochem.* 41.4 (1983): 950-56.
- Simon, E. J. "In search of the opiate receptor." *Am.J.Med.Sci.* 266.3 (1973): 160-68.
- Sinor, A. D., S. M. Irvin, and D. A. Greenberg. "Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats." *Neurosci.Lett.* 278.3 (2000): 157-60.
- Skaper, S. D., et al. "The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93.9 (1996): 3984-89.
- Snow, B. E., et al. "Molecular cloning and expression analysis of rat Rgs12 and Rgs14." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 233.3 (1997): 770-77.

- Snow, B. E., et al. "A G protein gamma subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding to Gbeta5 subunits." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95.22 (1998): 13307-12.
- Snow, B. E., et al. "GTPase activating specificity of RGS12 and binding specificity of an alternatively spliced PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domain." *J.Biol.Chem.* 273.28 (1998): 17749-55.
- Snyder, S. H. and G. W. Pasternak. "Historical review: Opioid receptors." *Trends Pharmacol.Sci.* 24.4 (2003): 198-205.
- Soltoff, S. P., et al. "Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C." *J.Biol.Chem.* 273.5 (1998): 2653-60.
- Sondek, J. and D. P. Siderovski. "Ggamma-like (GGL) domains: new frontiers in G-protein signaling and beta-propeller scaffolding." *Biochem.Pharmacol.* 61.11 (2001): 1329-37.
- Song, C. and A. C. Howlett. "Rat brain cannabinoid receptors are N-linked glycosylated proteins." *Life Sci.* 56.23-24 (1995): 1983-89.
- Song, J. H., J. J. Waataja, and K. A. Martemyanov. "Subcellular targeting of RGS9-2 is controlled by multiple molecular determinants on its membrane anchor, R7BP." *J.Biol.Chem.* 281.22 (2006): 15361-69.
- Spaargaren, M. and J. R. Bischoff. "Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91.26 (1994): 12609-13.
- Sprang, S. R. "G protein mechanisms: insights from structural analysis." *Annu.Rev.Biochem.* 66 (1997): 639-78.
- Stamler, J. S., et al. "(S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif." *Neuron* 18.5 (1997): 691-96.
- Stanasila, L., et al. "Coupling efficacy and selectivity of the human mu-opioid receptor expressed as receptor-Galphi fusion proteins in Escherichia coli." *J.Neurochem.* 75.3 (2000): 1190-99.
- Standifer, K. M., G. C. Rossi, and G. W. Pasternak. "Differential blockade of opioid analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against various G protein alpha subunits." *Mol.Pharmacol.* 50.2 (1996): 293-98.
- Sternini, C., et al. "Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93.17 (1996): 9241-46.
- Stewart, S., et al. "Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization." *Mol.Cell Biol.* 19.8 (1999): 5523-34.
- Stoyanov, B., et al. "Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase." *Science* 269.5224 (1995): 690-93.
- Strack, S., et al. "Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density." *J.Biol.Chem.* 272.21 (1997): 13467-70.
- Strack, S., R. B. McNeill, and R. J. Colbran. "Mechanism and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor." *J.Biol.Chem.* 275.31 (2000): 23798-806.
- Sturani, E., et al. "The Ras Guanine nucleotide Exchange Factor CDC25Mm is present at the synaptic junction." *Exp.Cell Res.* 235.1 (1997): 117-23.
- Sweatt, J. D. "Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory." *Curr.Opin.Neurobiol.* 14.3 (2004): 311-17.
- Takida, S., C. C. Fischer, and P. B. Wedegaertner. "Palmitoylation and plasma membrane targeting of RGS7 are promoted by alpha o." *Mol.Pharmacol.* 67.1 (2005): 132-39.
- Tanda, G., F. E. Pontieri, and Chiara G. Di. "Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism." *Science* 276.5321 (1997): 2048-50.
- Tanda, G. and S. R. Goldberg. "Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms-a review of recent preclinical data." *Psychopharmacology (Berl)* 169.2 (2003): 115-34.
- Tang, L., et al. "Reversal of morphine antinociceptive tolerance and dependence by the acute supraspinal inhibition of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 317.2 (2006): 901-09.
- Taniguchi, K., et al. "Antinociceptive activity of CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist." *Br.J.Pharmacol.* 122.5 (1997): 809-12.
- Tanowitz, M. and Zastrow M. von. "A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors." *J.Biol.Chem.* 278.46 (2003): 45978-86.

- Tappe-Theodor, A., et al. "A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids." *J.Neurosci.* 27.15 (2007): 4165-77.
- Terenius, L. "Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain." *Acta Pharmacol.Toxicol.(Copenh)* 33.5 (1973): 377-84.
- Tesmer, J. J., et al. "Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis." *Cell* 89.2 (1997): 251-61.
- Thibault, C., M. W. Sganga, and M. F. Miles. "Interaction of phosducin-like protein with G protein betagamma subunits." *J.Biol.Chem.* 272.19 (1997): 12253-56.
- Thomas, B. F., X. Wei, and B. R. Martin. "Characterization and autoradiographic localization of the cannabinoid binding site in rat brain using [3H]11-OH-delta 9-THC-DMH." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 263.3 (1992): 1383-90.
- Thomas, E. A., P. E. Danielson, and J. G. Sutcliffe. "RGS9: a regulator of G-protein signalling with specific expression in rat and mouse striatum." *J.Neurosci.Res.* 52.1 (1998): 118-24.
- Thornton, C., et al. "H-Ras modulates N-methyl-D-aspartate receptor function via inhibition of Src tyrosine kinase activity." *J.Biol.Chem.* 278.26 (2003): 23823-29.
- Thulin, C. D., et al. "Modulation of the G protein regulator phosducin by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding." *J.Biol.Chem.* 276.26 (2001): 23805-15.
- Tingley, W. G., et al. "Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain." *Nature* 364.6432 (1993): 70-73.
- Tingley, W. G., et al. "Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies." *J.Biol.Chem.* 272.8 (1997): 5157-66.
- Trafton, J. A., et al. "Postsynaptic signaling via the [mu]-opioid receptor: responses of dorsal horn neurons to exogenous opioids and noxious stimulation." *J.Neurosci.* 20.23 (2000): 8578-84.
- Traver, S., et al. "RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of galphao." *Biochem.J.* 350 Pt 1 (2000): 19-29.
- Traver, S., et al. "The RGS (regulator of G-protein signalling) and GoLoco domains of RGS14 co-operate to regulate Gi-mediated signalling." *Biochem.J.* 379.Pt 3 (2004): 627-32.
- Trejo, J., S. R. Hammes, and S. R. Coughlin. "Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95.23 (1998): 13698-702.
- Trendelenburg, A. U., et al. "Modulation of (3)H-noradrenaline release by presynaptic opioid, cannabinoid and bradykinin receptors and beta-adrenoceptors in mouse tissues." *Br.J.Pharmacol.* 130.2 (2000): 321-30.
- Trujillo, K. A. and H. Akil. "Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801." *Science* 251.4989 (1991): 85-87.
- Tsu, R. C., et al. "Role of amino- and carboxyl-terminal regions of G(alphaZ) in the recognition of Gi-coupled receptors." *Mol.Pharmacol.* 52.1 (1997): 38-45.
- Tzavara, E. T., et al. "The cannabinoid CB(1) receptor antagonist SR141716A increases norepinephrine outflow in the rat anterior hypothalamus." *Eur.J.Pharmacol.* 426.3 (2001): R3-R4.
- Tzavara, E. T., M. Wade, and G. G. Nomikos. "Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action." *J.Neurosci.* 23.28 (2003): 9374-84.
- Ueda, H., et al. "Protein kinase C involvement in homologous desensitization of delta-opioid receptor coupled to Gi1-phospholipase C activation in Xenopus oocytes." *J.Neurosci.* 15.11 (1995): 7485-99.
- Urigen, L., et al. "Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors." *Neuropharmacology* 46.7 (2004): 966-73.
- Usui, H., et al. "RGS domain in the amino-terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 inhibits Gq-mediated signaling." *Int.J.Mol.Med.* 5.4 (2000): 335-40.
- Vallee, B. L. and D. S. Auld. "Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90.7 (1993): 2715-18.
- Ventayol, P., X. Busquets, and J. A. Garcia-Sevilla. "Modulation of immunoreactive protein kinase C-alpha and beta isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain." *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 355.4 (1997): 491-500.
- Vigano, D., et al. "Molecular mechanisms involved in the asymmetric interaction between cannabinoid and opioid systems." *Psychopharmacology (Berl)* 182.4 (2005): 527-36.

- Vossler, M. R., et al. "cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway." *Cell* 89.1 (1997): 73-82.
- Vyklicky, L. "[Present trends in the neurophysiological study of pain]." *Cesk.Neurol.Neurochir.* 47.3 (1984): 133-42.
- Walwyn, W. M., et al. "Functional coupling, desensitization and internalization of virally expressed mu opioid receptors in cultured dorsal root ganglion neurons from mu opioid receptor knockout mice." *Neuroscience* 123.1 (2004): 111-21.
- Wang, H., K. N. Gracy, and V. M. Pickel. "Mu-opioid and NMDA-type glutamate receptors are often colocalized in spiny neurons within patches of the caudate-putamen nucleus." *J.Comp Neurol.* 412.1 (1999): 132-46.
- Wang, H. L. "A cluster of Ser/Thr residues at the C-terminus of mu-opioid receptor is required for G protein-coupled receptor kinase 2-mediated desensitization." *Neuropharmacology* 39 (2000): 353-363
- Wang, H. L., Chang, W. T., Hsu, C. Y., Huang, P. C., Chow, Y. W., Li, A. H. "Identification of two C-terminal amino acids, Ser(355) and Thr(357), required for short-term homologous desensitization of mu-opioid receptors." *Biochem. Pharmacol* 64 (2002): 257-266
- Wang, J. Q., E. E. Fibuch, and L. Mao. "Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors." *J.Neurochem.* 100.1 (2007): 1-11.
- Wang, Z. J. and L. X. Wang. "Phosphorylation: a molecular switch in opioid tolerance." *Life Sci.* 79.18 (2006): 1681-91.
- Watson, N., et al. "RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits." *Nature* 383.6596 (1996): 172-75.
- Waugh, J. L., et al. "Regional, cellular, and subcellular localization of RGS10 in rodent brain." *J.Comp Neurol.* 481.3 (2005): 299-313.
- Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais. "The RAF proteins take centre stage." *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5.11 (2004): 875-85.
- Werling, L. L., P. N. McMahon, and B. M. Cox. "Selective changes in mu opioid receptor properties induced by chronic morphine exposure." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86.16 (1989): 6393-97.
- Wilkins, J. F., M. W. Bitensky, and B. M. Willardson. "Regulation of the kinetics of phosducin phosphorylation in retinal rods." *J.Biol.Chem.* 271.32 (1996): 19232-37.
- Willard, F. S., et al. "Regulator of G-protein signaling 14 (RGS14) is a selective H-Ras effector." *PLoS.One.* 4.3 (2009): e4884.
- Willard, M. D., et al. "Selective role for RGS12 as a Ras/Raf/MEK scaffold in nerve growth factor-mediated differentiation." *EMBO J.* 26.8 (2007): 2029-40.
- Williams, J. T., M. J. Christie, and O. Manzoni. "Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence." *Physiol Rev.* 81.1 (2001): 299-343.
- Winstel, R., et al. "Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93.5 (1996): 2105-09.
- Wong, Y. H., B. R. Conklin, and H. R. Bourne. "Gz-mediated hormonal inhibition of cyclic AMP accumulation." *Science* 255.5042 (1992): 339-42.
- Xiong, X., et al. "Induction of zinc metallothionein by calcium ionophore in vivo and in vitro." *FEBS Lett.* 299.2 (1992): 192-96.
- Xiong, Z. G., et al. "Regulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by constitutively active protein kinase C." *Mol.Pharmacol.* 54.6 (1998): 1055-63.
- Yaksh, T. L., J. C. Yeung, and T. A. Rudy. "Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray." *Brain Res.* 114.1 (1976): 83-103.
- Yao, Y. and M. L. Mayer. "Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A." *J.Neurosci.* 26.17 (2006): 4559-66.
- Ye, B., et al. "GRASP-1: a neuronal RasGEF associated with the AMPA receptor/GRIP complex." *Neuron* 26.3 (2000): 603-17.
- Yoburn, B. C., et al. "Role of G(i)alpha2-protein in opioid tolerance and mu-opioid receptor downregulation in vivo." *Synapse* 47.2 (2003): 109-16.

- York, R. D., et al. "Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor." *Nature* 392.6676 (1998): 622-26.
- Yoshida, T., et al. "The phosphorylation state of phosphducin determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin." *J.Biol.Chem.* 269.39 (1994): 24050-57.
- Yu, X. M., et al. "NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src." *Science* 275.5300 (1997): 674-78.
- Yun, H. Y., et al. "Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate receptor-induced activation of p21ras." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95.10 (1998): 5773-78.
- Zachariou, V. et al. "Essential role for RGS9 in opiate action." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100.23 (2003): 13656-61.
- Zaki, P. A., et al. "Ligand-induced changes in surface mu-opioid receptor number: relationship to G protein activation?" *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 292.3 (2000): 1127-34.
- Zalewski, P. D., et al. "Synergy between zinc and phorbol ester in translocation of protein kinase C to cytoskeleton." *FEBS Lett.* 273.1-2 (1990): 131-34.
- Zalewski, P. D., et al. "Regulation of protein kinase C by Zn(2+)-dependent interaction with actin." *Biochem.Int.* 24.6 (1991): 1103-10.
- Zeitz, K. P., et al. "Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC gamma mutant mice." *Pain* 94.3 (2001): 245-53.
- Zhang, J. and C. Chen. "Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation." *J.Biol.Chem.* 283.33 (2008): 22601-11.
- Zhang, J. H. and W. F. Simonds. "Copurification of brain G-protein beta5 with RGS6 and RGS7." *J.Neurosci.* 20.3 (2000): RC59.
- Zhang, J. H., et al. "Nuclear localization of G protein beta 5 and regulator of G protein signaling 7 in neurons and brain." *J.Biol.Chem.* 276.13 (2001): 10284-89.
- Zhang, L., et al. "Differential mu opiate receptor phosphorylation and desensitization induced by agonists and phorbol esters." *J.Biol.Chem.* 271.19 (1996): 11449-54.
- Zhang, X. F., X. T. Hu, and F. J. White. "Whole-cell plasticity in cocaine withdrawal: reduced sodium currents in nucleus accumbens neurons." *J.Neurosci.* 18.1 (1998): 488-98.
- Zheng, B., Vries L. De, and Farquhar M. Gist. "Divergence of RGS proteins: evidence for the existence of six mammalian RGS subfamilies." *Trends Biochem.Sci.* 24.11 (1999): 411-14.
- Zheng, B., et al. "RGS-PX1, a GAP for GalphaS and sorting nexin in vesicular trafficking." *Science* 294.5548 (2001): 1939-42.
- Zhu, J. J., et al. "Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity." *Cell* 110.4 (2002): 443-55.
- Zhu, Y., et al. "Rap2-JNK removes synaptic AMPA receptors during depotentiation." *Neuron* 46.6 (2005): 905-16.
- Zippel, R., et al. "Ras-GRF, the activator of Ras, is expressed preferentially in mature neurons of the central nervous system." *Brain Res.Mol.Brain Res.* 48.1 (1997): 140-44.
- Zukin, R. S. and M. V. Bennett. "Alternatively spliced isoforms of the NMDARI receptor subunit." *Trends Neurosci.* 18.7 (1995): 306-13.



ANEXO
