



UNIVERSITAT DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR
APOPTÓTICO FAS EN LA ADICCIÓN A
OPIÁCEOS**

M. JULIA GARCÍA FUSTER

Julio 2005

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR APOPTÓTICO FAS
EN LA ADICCIÓN A OPIÁCEOS**

Tesis presentada por M. JULIA GARCÍA FUSTER para optar al grado de Doctora en Bioquímica por la Universidad de Barcelona, en el programa de doctorado de Biomedicina (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona). Trabajo realizado en el Laboratorio de Neurofarmacología, Departamento de Biología/IUNICS, Universidad de las Islas Baleares (UIB).

Los Directores de la Tesis:

Dr. Jesús A. García Sevilla
Catedrático de Farmacología (UIB)

Dr. Antonio Miralles Socías
Profesor Titular de Biología Celular (UIB)

El Tutor de la Tesis:

Dr. Rafael Franco
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular (UB)

Esta Tesis doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda económica de una Beca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Programa de colaboración CSIC-DGU del Ministerio de Educación y Ciencia para la formación de doctores en el marco de las Unidades Asociadas, disfrutada durante los años 2002-2005. Laboratorio de Neurofarmacología, Unidad Asociada del Instituto de Neurobiología ‘Santiago Ramón y Cajal’ (CSIC), Departamento de Biología, Universidad de las Islas Baleares (1997-2003).

El trabajo de Tesis se ha realizado dentro de los proyectos de investigación BFI2000-0306 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid), SAF2004-03685 (Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid) y FNSRS32-57066.99 (Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique, Berna), cuyo investigador principal es el Dr. Jesús A. García Sevilla.

Durante la elaboración de esta Tesis doctoral he tenido la oportunidad de ampliar mi formación predoctoral con dos estancias en la Unidad de Investigación Clínica del Departamento de Psiquiatría (Prof. José Guimón) de la Universidad de Ginebra (mayo-junio de 2002), así como en el laboratorio de Neurofarmacología del Dr. Javier Garzón y la Dra. Pilar Sánchez-Blázquez del Instituto de Neurobiología ‘Santiago Ramón y Cajal’, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (mayo-junio de 2003).

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Jesús A. García Sevilla y al Dr. Antonio Miralles Socias, como directores de esta Tesis doctoral, por haberme ofrecido la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y por la constante ayuda recibida durante estos años, en especial al Dr. García Sevilla por todo lo que nuestra relación supone y conlleva.

También quiero agradecer al Dr. José Guimón, antiguo Jefe del Departamento de Psiquiatría de la Universidad de Ginebra (Suiza) y actualmente en la Universidad del País Vasco, así como al Dr. Javier Garzón y a la Dra. Pilar Sánchez-Blázquez del Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto de Neurobiología ‘Santiago Ramón y Cajal’ (CSIC, Madrid) la valiosa ayuda prestada y el haberme dado la oportunidad de ampliar mi formación predoctoral trabajando en colaboración con ellos.

De igual manera me gustaría agradecer la amistad y la ayuda ofrecida por todos los miembros de los distintos grupos de investigación en los que he trabajado, especialmente a los del laboratorio de Neurofarmacología, así como a los amigos de siempre que me han acompañado durante estos cuatro años.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCIÓN	5
MECANISMOS DE LA APOPTOSIS Y SISTEMA FAS/FADD	5
La vía extrínseca	7
La vía mitocondrial	11
APOPTOSIS EN EL SISTEMA NERVIOSO	14
FÁRMACOS OPIÁCEOS	15
RECEPTORES OPIOIDES	16
Receptor μ -opioide (NC-IUPHAR: receptor MOP)	17
Receptor δ -opioide (NC-IUPHAR: receptor DOP)	17
Receptor κ -opioide (NC-IUPHAR: receptor KOP)	18
Receptor de nociceptina (NC-IUPHAR: receptor NOP)	18
Otros receptores	18
Características de los receptores opioides	19
Afinidades por los receptores opioides de los fármacos utilizados en este estudio	22
ADICCIÓN A OPIÁCEOS	23
Sistemas post-receptor	26
Vía del AMPc	27
Vía de las MAPK	27
IMPLICACIÓN DE LOS OPIÁCEOS Y OTRAS DROGAS DE ABUSO EN LA APOPTOSIS	29

EL SISTEMA FAS/FADD COMO TRANSDUCTOR DE SEÑALES NO APOPTÓTICAS. CONEXIONES CON LA VÍA MAPK ERK1/2	31
II. OBJETIVOS	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
MATERIALES	37
FÁRMACOS	37
ANTICUERPOS	38
Anticuerpos primarios	38
Anticuerpos secundarios	39
REACTIVOS Y MATERIALES	39
APARATOS UTILIZADOS	41
MÉTODOS	42
MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN (MUESTRAS BIOLÓGICAS)	42
Experimentos en cerebro de rata	42
Experimentos en cerebro de ratón	42
Ratones CD-1	42
Modelo KO (ratones deficientes en receptores opioides)	43
Experimentos en cerebro humano	44
Experimentos en células SH-SY5Y	44
TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS	45
Experimentos en cerebro de rata	45
Tratamientos agudos	45
Tratamientos crónicos	46
Otros tratamientos en ratas	48
Experimentos en cerebro de ratón (MODELO KO)	49

Modelo humano (experimentos en cerebro humano <i>postmortem</i>)	49
Experimentos en células SH-SY5Y	54
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	55
Homogenización de tejido cerebral de rata	55
Preparación de fracción citosólica	55
Preparación de membranas corticales	56
Deglicosilación de Fas	56
Disociación de agregados de Fas	56
Preparación de homogenado total	57
Defosforilación enzimática	57
Fraccionamiento subcelular	58
Homogenización de tejido cerebral de ratón	58
Homogenización de tejido cerebral humano	59
Determinación de proteínas	59
Método de Lowry	59
Método de Bradford	60
Método del Ácido Bicinconínico (BCA)	60
Efecto del proceso congelación-descongelación de las muestras	61
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIANA MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS (“WESTERN BLOTTING”)	62
Condiciones experimentales de la electroforesis en geles de poliacrilamida y “Western Blotting”	62
Reciclado de las membranas de nitrocelulosa (“Stripping”)	68
Experimentos preliminares para optimizar la detección de proteínas diana	69
Detección de Fas nativo (35 kDa) y glicosilado (48 y 51 kDa) en tejidos cerebrales y en células SH-SY5Y	69

Detección de agregados de Fas (120 y 203 kDa) en tejidos cerebrales y en células SH-SY5Y	72
Detección de la proteína de acople FADD en tejidos cerebrales	72
Efecto del retraso autopsico (PMD) y de la edad sobre las inmunodensidades de los componentes de la cascada de señalización de las MAPK en cerebro humano	75
Efecto del retraso autopsico (PMD) sobre las inmunodensidades de las proteínas de la vía apoptótica iniciada a través de Fas/ FADD en cerebro humano	76
Cuantificación fotodensitométrica	77
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	79
IV. RESULTADOS	81
ARTÍCULO I. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain	81
ARTÍCULO II. Modulation of Fas receptor proteins and dynamin during opiate addiction and induction of opiate withdrawal in rat brain	91
ARTÍCULO III. Deglycosylation of Fas receptor and chronic morphine treatment up-regulate high molecular mass Fas aggregates in the rat brain	105
ARTÍCULO IV. Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: Regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway	115
ANEXO EXPERIMENTAL I. Regulación del complejo Fas/FADD en ratones deficientes en receptores opioides	155
ARTÍCULO V. Long-term regulation of signalling components of adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase in the pre-frontal cortex of human opiate addicts	161
ANEXO EXPERIMENTAL II. Modulación del factor de transcripción Elk-1 en cerebro de adictos a opiáceos	175

ANEXO EXPERIMENTAL III. Modulación del complejo Fas/FADD y caspasas efectoras en cerebros de adictos a opiáceos	177
V. DISCUSIÓN	181
VI. CONCLUSIONES	201
VII. BIBLIOGRAFÍA	203

ABREVIATURAS

AC, adenilato ciclasa.

AIF, factor inductor de apoptosis.

A(L), adictos a opiáceos “long-term abuse”.

A(S), adictos a opiáceos “short-term abuse”.

AMG, amígdala.

AMPc, adenosina monofosfato 3',5'-cíclico.

ANOVA, análisis de la varianza.

Apaf-1, factor de activación de la proteasa apoptótica.

Apo-1, proteína apoptótica-1.

APS, persulfato de amonio.

ARC, núcleo arcuato.

BCA, ácido bicinconínico.

BSA, albúmina bovina sérica.

CaMKII, Ca²⁺/calmodulina quinasa II.

CARD, dominio de reclutamiento de caspasas.

cdk-5, quinasa dependiente de ciclina-5.

Cer, cerebelo.

CD95, proteína dependiente de citotoxicidad 95.

CD95L, ligando de la proteína dependiente de citotoxicidad 95.

C-P, caudado-putamen.

CRD, dominio rico en cisteínas.

CRE, elemento de respuesta nuclear al AMPc.

CREB, proteína de unión a CRE (“cAMP regulated element binding protein”)

DAMGO, [_D-Ala², Me-Phe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina.

DD, dominio de muerte.

DED, dominio efector de muerte.

DISC, complejo de señalización inductor de muerte.

DMSO, dimetil sulfóxido.

DMT, tálamo dorsomedial.

DOI, densidad óptica integrada.

DOP o DOR, receptor δ -opioide.

ECL, sistema de quimioluminiscencia amplificada.

EDTA, ácido tetraacético etilendiamina.

Elk-1, Ets-like protein-1.

ERK, quinasas reguladas por señales extracelulares.

ESM, error estándar de la media.

FADD, proteína con dominio de muerte asociada a Fas.

FLIP, proteína inhibidora de la caspasa-8.

GRK, quinasas de receptores acoplados a proteínas G.

H, homogenado total.
HB, cerebro humano.
HRP, peroxidasa de rábano.
IC, colículo inferior.
IUPHAR, Unión Internacional de Farmacología.
JNK, proteínas c-Jun N-terminales.
KOP o KOR, receptor κ -opioide.
LB, tampón de carga.
LBD, dominio de unión del ligando.
LC, locus coeruleus.
LH, hipotálamo lateral.
MAM, 6-monoacetilmorfina.
MAPK, proteínas quinasas activadas por mitógenos.
MB, cerebro de ratón.
MDMA, 3,4-metilendioximetanfetamina.
MEK, quinasas activadas por mitógenos extracelulares.
Met, metadona libre.
MOP o MOR, receptor μ -opioide.
Mor, morfina libre.
MPP⁺, metabolito citotóxico tras activación de MPTP.
MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.
N, fracción nuclear.
NAc, núcleo accumbens.
NC, nomenclatura.
NEM, N-etilmaleimida.
NES, secuencia de exportación nuclear.
NF-H, neurofilamento de alto peso molecular.
NF-L, neurofilamento de bajo peso molecular.
NF-M, neurofilamento de peso molecular medio.
NLS, secuencia de localización nuclear.
NMM, N-metilmaleimida.
NOP o NOR, receptor de nociceptina.
N/OFQ, nociceptina/orfanina FQ.
NT, no testado.
ORL, receptor con características tipo receptor opioide.
OT, tubérculo olfativo.
PA, poliacrilamida.
PAG, sustancia gris periaqueductal.
PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida.
PBS, tampón fosfato salino.
PC, control positivo.

PFC, corteza prefrontal.
PKA, proteína quinasa A.
PKC, proteína quinasa C.
PMD, retraso autópsico.
PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
pCREB, forma fosforilada de CREB.
P2, fracción membranal.
RB, cerebro de rata.
S2, fracción citosólica.
SAPK, quinasas activadas por señales de stress.
SC, colículo superior.
SDS, dodecil sulfato sódico.
SNC, sistema nervioso central.
SNP, sistema nervioso periférico.
SNr, sustancia negra.
T-20, Tween-20 o monolaureato de polioxietileno-sorbitan.
TBS, tampón Tris salino.
TL, tiempo de latencia.
TM, dominio transmembrana.
TNF, factor de necrosis tumoral.
TNFR, receptor del factor de necrosis tumoral.
VP, área anatómica del pálido ventral.
VTA, área ventral tegmental.
WB, “Western Blotting”.

I. INTRODUCCIÓN

MECANISMOS DE LA APOPTOSIS Y SISTEMA FAS/FADD

El fenómeno de apoptosis, expuesto con otros términos, fue descrito por primera vez por Vogt en 1842 y redescubierto varias veces en las décadas sucesivas en base a una morfología característica de algunas células. En 1972, Kerr y colaboradores utilizaron el término apoptosis, del término griego ‘hojas cayendo del árbol’, para describir el mecanismo intrínseco de un suicidio celular programado involucrado en el recambio normal de hepatocitos (Kerr *et al.*, 1972). Estos autores fueron los primeros en realizar una clara distinción entre la morfología celular de la apoptosis y de la necrosis. Actualmente, aún se cree que muchas características de la apoptosis son comunes para casi todos los tipos celulares. La apoptosis engloba todos aquellos mecanismos involucrados en mediar la biología celular de la muerte celular programada, descrita como una forma fisiológica de suicidio celular con un papel muy relevante en la embriogénesis, la metamorfosis y la homeostasis celular, y también como un mecanismo de defensa para eliminar células infectadas, mutadas, o dañadas (revisiones con especial énfasis en el SNC: Kinloch *et al.*, 1999; Nijhawan *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2000; Yuan y Yankner, 2000; Sastry y Rao, 2000; Gupta, 2001a, 2001b). En contraste con la necrosis, la apoptosis se caracteriza por mantener la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en el proceso de muerte en los que la membrana se va arrugando a medida que el volumen celular disminuye. Mientras los contenidos lisosomales permanecen intactos, el fraccionamiento celular prosigue su curso formando los cuerpos apoptóticos, unas vesículas pequeñas unidas a la membrana que son fagocitadas por las células vecinas. El criterio de definición de la apoptosis depende principalmente de estas características morfológicas y de la posible variación entre los marcadores genéticos y bioquímicos de un tipo celular a otro. Sin embargo, una característica distintiva de la apoptosis a nivel bioquímico es la fragmentación de DNA. El proceso apoptótico en células es dependiente de energía y puede depender de la síntesis de nuevas proteínas, diferencia clave con la necrosis donde falla el suplemento de energía celular y la síntesis de proteína se interrumpe. Estos procesos morfológicos y bioquímicos son principalmente mediados por efectores de muerte, como podrían ser las proteasas, que conllevaran a la fragmentación nuclear y celular. Antes de la activación de estas vías efectoras de muerte, el balance entre vida/muerte de la célula está modulado por una compleja interacción entre los distintos activadores de muerte. Una vez la balanza se inclina hacia la muerte celular, los efectores de muerte empiezan a actuar.

Los mecanismos moleculares de la apoptosis (i.e., la detallada cascada de eventos desde la superficie celular hasta los cambios finales en el núcleo) no están todavía completamente esclarecidos, aunque se conocen varias de las proteínas clave que están implicadas en la regulación de la muerte celular programada (Kinloch *et al.*, 1999; Sastry y Rao, 2000). Se han descrito dos vías principales que conllevan a la apoptosis celular, la vía extrínseca o vía del receptor de muerte, y la vía intrínseca o vía mitocondrial (véase figura 1; Ashkenazi *et al.*, 1998; Gupta, 2000; Nijhawan *et al.*, 2000), aunque existen evidencias recientes que sugieren que en ciertos tipos celulares estas dos vías deben estar unidas (Gupta, 2000). Los mecanismos de acción de los agentes apoptóticos, tanto intracelulares como extracelulares, convergen para activar un grupo específico de proteasas específicas para aspartatos y cisteínas denominadas caspasas, que existen como zimógenos inactivos en las células vivas y son activados por rotura proteolítica (Thornberry y Lazebnik, 1998). Las caspasas iniciadoras son capaces de activar caspasas efectoras o de amplificar la señal, incrementando su propia activación (véase Wang *et al.*, 2005), hasta culminar en la muerte celular (Cohen, 1997; Thornberry y Lazebnik, 1998).

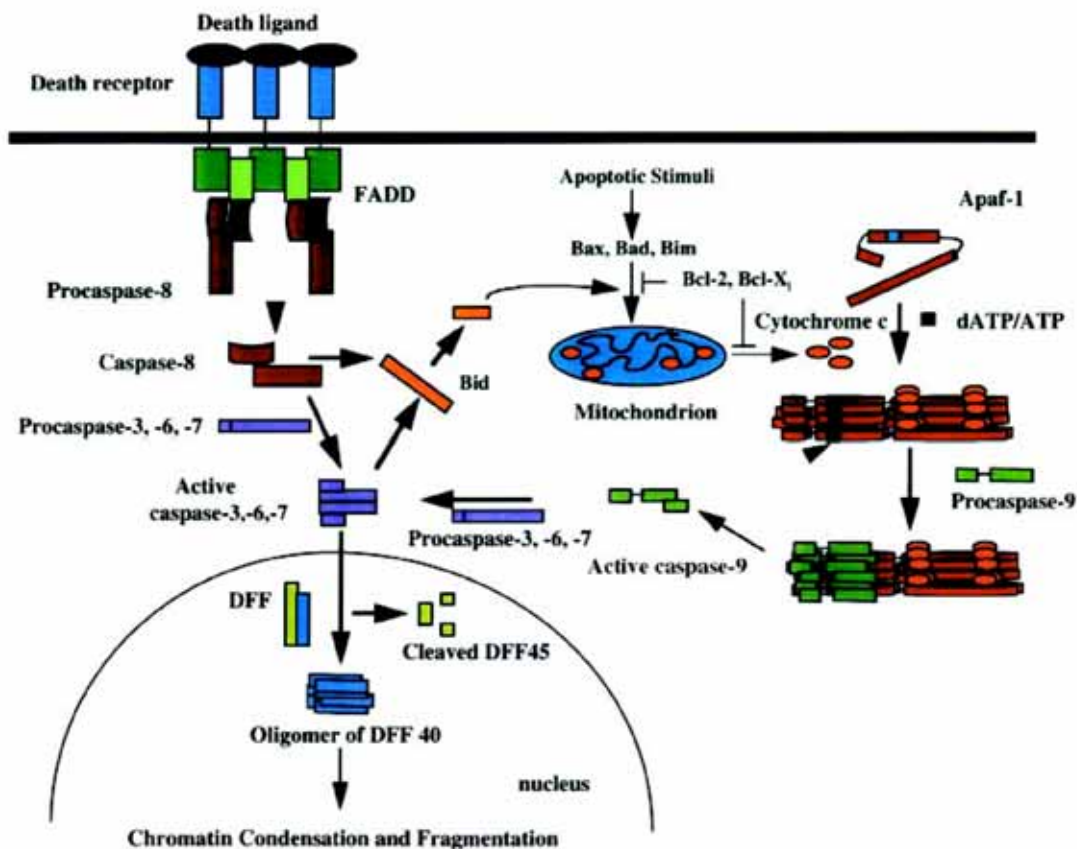


Figura 1. Vías apoptóticas celulares: vía del receptor de muerte (Fas/FADD/Caspasa-8/3) y vía mitocondrial (Citocromo c/Apaf-1/Caspasa-9).

(Tomado de Nijhawan *et al.*, 2000)

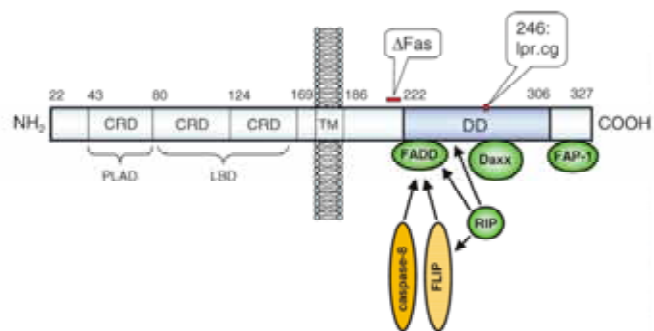
Vía extrínseca (mediada a través de receptores de muerte)

La vía extrínseca requiere la participación de receptores de membrana para su activación (Ashkenazi y Dixit, 1998). Estos receptores de muerte pertenecen a la superfamilia génica de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR, “tumor necrosis factor receptor”) que se caracteriza por tener un dominio extracelular rico en cisteínas y una secuencia citoplasmática homóloga, el dominio de muerte (DD, “death domain”). Generalmente, el DD permite a los receptores de muerte iniciar una cascada de eventos que conllevan a la apoptosis, aunque a veces también pueden mediar funciones anti-apoptóticas (véase el apartado, El sistema Fas/FADD como transductor de señales intracelulares). Sin embargo, algunos miembros de la superfamilia de receptores de muerte no tienen el dominio de muerte pero aún y así pueden mediar una señal apoptótica.

El receptor Fas (también conocido como proteína dependiente de citotoxicidad, CD95 o proteína apoptótica-1, Apo-1) es un miembro prototipo de la superfamilia de receptores de muerte del factor de necrosis tumoral/factor de crecimiento nervioso (Itoh *et al.*, 1991; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992; Nagata y Golstein, 1995; Nagata, 1999; Orlinick *et al.*, 1999), que se expresa de manera abundante en varios tejidos (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992), en células nerviosas (Bechmann *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 1999) y en membranas de cerebro de mamíferos (resultados de este trabajo de Tesis doctoral), y que juega un papel importante en la apoptosis (MacEwan, 2002). Fas, es una proteína transmembranal de tipo I que presenta en su dominio extracelular dos lugares de N-glicosilación y una región rica en cisteínas donde se une el ligando (Fas-L), y un dominio de muerte intracelular cercano al extremo carboxilo terminal de la molécula (véase figura 2; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992; Orlinick *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 2003).

Figura 2. Representación lineal del receptor Fas de ratón (dibujo a escala), junto con sus proteínas de interacción conocidas. La numeración aminoacídica está basada en la secuencia de NCBI (ref. P25446). El lugar exacto de unión de FADD aún no se conoce. La mutación local en lpr.cg desacopla al DD, previniendo la unión de FADD.

(Tomado de Lambert *et al.*, 2003)



Abreviaturas: CRD, dominio rico en cisteínas; LBD, dominio de unión del ligando; TM, dominio transmembrana; FADD, proteína dominio de muerte asociada a Fas; DD, dominio de muerte; FLIP, proteína inhibidora de caspasa-8.

Por otro lado, el ligando Fas (FasL o CD95L), que pertenece a la familia génica del factor de necrosis tumoral (TNF), es una glicoproteína de superficie celular homotrimérica de tipo II con un peso aproximado de 40 kDa, con el extremo N-terminal citosólico y el extremo C-terminal orientado extracelularmente. En contraste con el receptor Fas, que se expresa constitutivamente en gran número de tipos celulares, la expresión de su ligando (Fas-L o CD95L) está restringida, como es el caso de las células T en reposo, donde no hay CD95L, pero en las que se induce su expresión tras activar las células (Suda *et al.*, 1995). Como en ciertos tumores también se expresa el ligando de Fas se sugirió que la apoptosis podría funcionar como un posible mecanismo de escapada frente a una supervivencia inmunológica (Hahne *et al.*, 1996; Strand y Galle, 1998).

Tras la activación del receptor Fas por su ligando soluble o asociado a la célula, la proteína trimeriza formando microagregados (figura 3). En estudios recientes, se ha sugerido que para inducir la formación de estos complejos supramoleculares Fas-FasL de elevada estabilidad son suficientes los dominios extracelulares de Fas y Fas-L por sí solos (Henkler *et al.*, 2005).

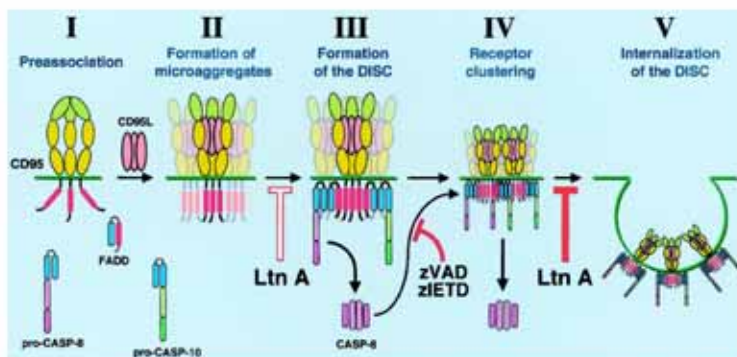


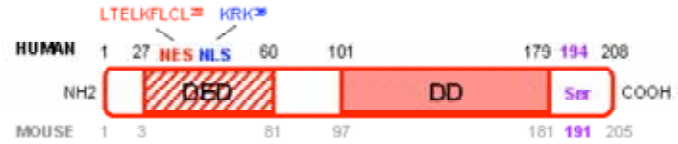
Figura 3. Eventos de la señalización de Fas proximales a la membrana. Las fases de señalización iniciales de CD95 se pueden dividir en 5 pasos. (I) Preasociación independiente de ligando. (II) Formación de microagregados (detectables por SDS-PAGE). (III) Formación del DISC (complejo de señalización inductor de muerte). (IV) Formación de complejos acoplados de receptor. (V) Internalización del DISC. (DED: dominios azules; DD, dominios rosas).

(Tomado de Ageciras-Schimmich *et al.*, 2002)

Lo que ocurre es que la agregación de los dominios de muerte del receptor Fas (CD95) conlleva al reclutamiento de una molécula adaptadora citoplasmática que también contiene un dominio de muerte (en su región carboxi-terminal; véase figura 4), el FADD (“Fas-associated death domain”, proteína con dominio de muerte asociada a Fas). La proteína FADD presenta un único lugar de fosforilación de serina (Ser 194 para humano y Ser 191 para ratón; véase figura 4) que es esencial, en otras funciones, para la regulación del ciclo celular y de la supervivencia/proliferación en algunas células (Scaffidi *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004).

El dominio amino-terminal de FADD se denomina el dominio efector de muerte (DED, “death effector domain”; véase figura 4) y es el responsable de reclutar la procaspasa-8, que tras dimerizar se autoactiva proporcionando la forma madura del enzima con el consecuente inicio de la cascada apoptótica (véase figura 5; Tourneur *et al.*, 2005).

Figura 4. Proteína FADD de origen humano y de ratón. El DD (dominio de muerte) y el DED (dominio efector de muerte) son esenciales para la interacción con receptores de muerte, como el Fas, y para la transmisión de la señal apoptótica.



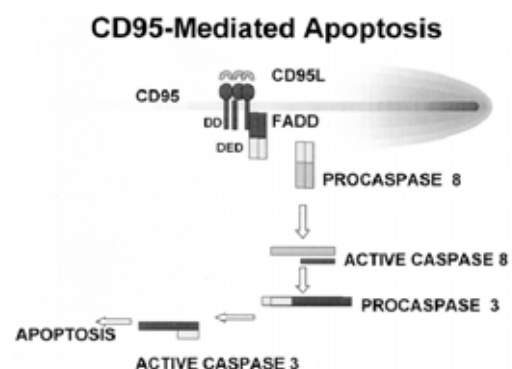
La secuencia humana de exportación nuclear (NES en rojo) y la secuencia de localización nuclear (NLS en azul) determinan la localización de la proteína en el citoplasma o en el núcleo, y se asocian con funciones de la proteína FADD de muerte celular y de supervivencia, respectivamente. Los lugares de fosforilación (Ser 194 para humano y Ser 191 para ratón se muestran en lila) tienen un papel crucial en señales de supervivencia/proliferación y progresión de ciclo celular.

(Tomado de Tourneur *et al.*, 2005)

La proteína transductora FADD se expresa en citoplasma y en núcleo (Gómez-Angelats y Cidlowski, 2003; resultados de este trabajo de Tesis), pero después de unirse al receptor Fas, la proteína citoplasmática es rápidamente reclutada a la membrana plasmática donde formara, junto con el receptor y la procaspasa-8, el complejo de señalización inductor de muerte (DISC, “death-inducing signaling complex”) (Kischkel *et al.*, 1995; Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002; véase paso III en la figura 3). Entonces, y como se ha mencionado previamente, la procaspasa-8 se rompe autolíticamente dando caspasa-8 (forma activa) que rompe y activa a su vez caspasas efectoras de la cascada (e.g., caspasa 3; véase figura 5), lo que permite la fragmentación de numerosos substratos hasta provocar la muerte celular (MacEwan, 2002). La muerte celular inducida por Fas en el sistema nervioso (Felderhoff-Mueser *et al.*, 2000) comparte los mismos mecanismos básicos de actuación que han sido descritos en células periféricas (Sastry y Rao, 2000).

Figura 5. Vía de muerte CD95/ CD95L.

(Tomado de Gupta, 2001b)



Una vez la caspasa-8 se ha activado puede seguir dos caminos, o bien activar la cascada de caspasas que se acaba de describir, o bien actuar sobre un miembro de la familia de proteínas Bcl-2, el Bid. La forma truncada de Bid (tBid) puede translocar hacia la mitocondria (véanse figuras 1 y 6), donde, por un mecanismo aún no esclarecido, activaría la vía mitocondrial (véase más abajo). En algunos tipos celulares, donde se forman cantidades suficientes del complejo DISC (e.g. la línea celular BJAB), ocurre una activación directa de la apoptosis, vía caspasas efectoras. Estas células se conocen como células de tipo I. Por contra, en otros tipos celulares, como ocurre para la línea celular Jurkat, la cantidad del complejo DISC que se forma no es suficiente para activar la muerte celular por lo que requiere amplificar la señal a través de la mitocondria para poder así activar caspasas y conllevar a la fragmentación del DNA (véase figura 6). Estas células de tipo II utilizan una vía de señalización de Fas dependiente de la mitocondria (Mundle y Raza, 2002; Barnhart *et al.*, 2003). En este punto las vías extrínseca y intrínseca convergen. Todavía no se ha aclarado del todo qué células nerviosas corresponden al tipo I o tipo II, aunque probablemente se den los dos.

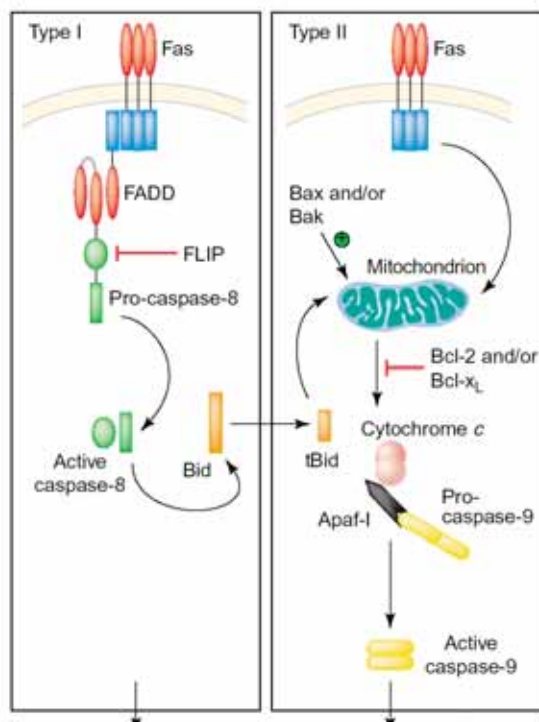
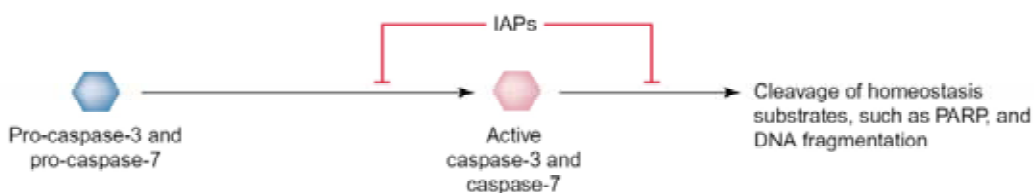


Figura 6. Múltiples vías de señalización de la muerte inducida por Fas. En las células de tipo I, hay suficiente formación del complejo DISC como para que la caspasa-8 sea capaz de activar las caspasas efectoras. Sin embargo, en las células de tipo II, en las que no se forman cantidades suficientes del complejo DISC, tras la activación del receptor Fas se requiere la amplificación de la señal a través de la mitocondria. Esta amplificación será la que permitirá la activación de las caspasas efectoras que conllevarán a la muerte celular.

(Tomado de Mundel y Raza, 2002)



Vía intrínseca (vía mitocondrial)

Una vía independiente de los receptores de muerte es la vía apoptótica mitocondrial (vía intrínseca) (véase figura 7) (Sastry y Rao, 2000; Gupta, 2001a; Zimmermann *et al.*, 2001; Ashe y Berry, 2003), que parece estar mediada por ciertos estímulos tipo agentes quimioterapéuticos, radiación UV, moléculas de estrés (especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno). Aunque, esta vía intrínseca, como se acaba de ver, también puede ser utilizada por los receptores de muerte para amplificar su señal inductora de apoptosis (Mundle y Raza, 2002).

La familia del proto-oncogen que incluye proteínas tipo Bcl-2 (familia Bcl-2) está involucrada en el control de la apoptosis en distintos tipos celulares, participando como activadores o inhibidores de muerte intracelulares. Algunos miembros de la familia de proteínas Bcl-2, como el propio Bcl-2 y Bcl-XL, suprimen la apoptosis (anti-apoptóticos), mientras que otros miembros, como los homólogos Bax y Bak, son pro-apoptóticos (Adams y Cory, 1998). Los miembros de la familia de proteínas tipo Bcl-2 presentan hasta 4 regiones muy conservadas, denominadas regiones de homología del Bcl-2. El dominio BH-3 (uno de los 4 dominios conservados) parece ser el más importante en miembros anti-apoptóticos (e.g., Bcl-2) de la familia para la activación de la muerte celular y para la dimerización de estas proteínas, mientras que en los pro-apoptóticos (e.g., Bax) se encargará de mediar su actividad citotóxica. Se ha considerado que la dimerización es un mecanismo de acción de estas proteínas.

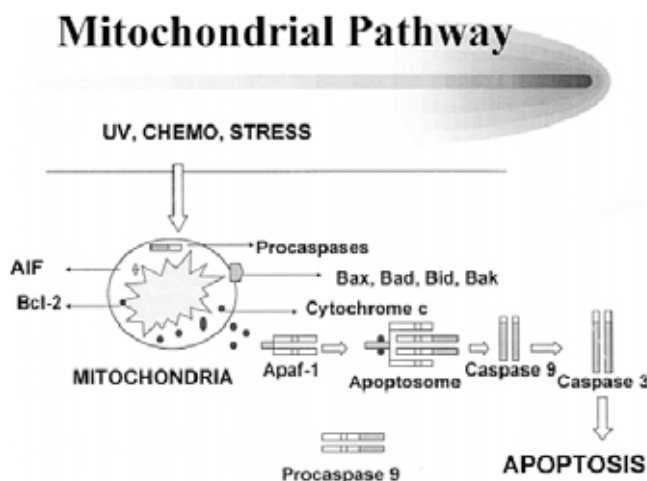


Figura 7. Vía apoptótica mitocondrial.

(Tomado de Gupta, 2001a)

El Bcl-2 es una oncoproteína de 26 kDa principalmente localizada en las membranas mitocondriales internas (véase figura 7). Se le ha atribuido un papel neuroprotector frente a la muerte celular apoptótica (Hockenbery *et al.*, 1990), probablemente previniendo la liberación de citocromo c (inducida por Bax) y la subsiguiente activación de caspasas efectoras (Adams y Cory, 1998; Sastry y Rao, 2000; Yuan y Yanker, 2000). La liberación de citocromo c, por tanto, viene regulada por miembros de la familia de proteínas del Bcl-2, tanto miembros anti-apoptóticos (Bcl-2 y Bcl-x_L) como pro-apoptóticos (Bax, Bim, Bad, y Bax) (Adams y Cory, 1998), facilitando o inhibiendo su liberación hacia el citoplasma. Así, como ejemplo, tanto los niveles de mRNA de Bax como la cantidad de proteína se encontraron incrementados en la sustancia negra de ratones tratados con MPTP, una neurotoxina que desencadena una degeneración de las neuronas dopaminérgicas por apoptosis (Hassouna *et al.*, 1996). Además, en esta línea se observó que la sobre-expresión de miembros anti-apoptóticos bloqueó la liberación de citocromo c inducida por ciertos estímulos apoptóticos (Kim *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual las proteínas de la familia del Bcl-2 regulan y liberan el citocromo c desde la mitocondria hacia el citosol, aunque se cree que cambios de permeabilidad en la membrana mitocondrial podrían causar la rotura de la membrana exterior (Kroemer *et al.* 1997; Vander Heiden *et al.*, 1997).

Por tanto, una vez se ha liberado el citocromo c desde la mitocondria, se formará el apoptosoma por el ensamblamiento de Apaf-1 (“Apoptotic protease-activating factor”, factor de activación de la proteasa apoptótica) con la procaspasa-9 (véase figura 7). El factor Apaf-1 es un monómero citosólico de 130 kDa que contiene tres dominios distintivos: un dominio reclutador de caspasas, un dominio homólogo a CED4, y una serie de repeticiones WD40 (Zou *et al.*, 1997). El reclutamiento de la procaspasa-9 por el Apaf-1 a través de lo que se denomina CARD (“caspase recruiting domain”, dominio de reclutamiento de caspasas) requiere ATP. Después, la procaspasa-9 se rompe autolíticamente produciendo caspasa-9 activa, que se libera del complejo para activar otras caspasas (e.g., caspasa-3, 6 y 7) hasta provocar la rotura de otros substratos y la apoptosis. Por tanto, la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol es un paso importante en la regulación de la activación de caspasas ya que no sólo inicia la activación de caspasas por activación de Apaf-1, sino que también rompe la cadena de transferencia de electrones generando una menor energía y especies oxigenadas más reactivas, debidas a la reducción incompleta del oxígeno atómico (Reed, 1997).

Algunas proteínas del espacio intermembranal pueden inducir apoptosis por una vía independiente de caspasas. Por ejemplo, el AIF (factor inductor de apoptosis), una vez liberado de la mitocondria, es transportado al núcleo, donde estimula (de manera ATP-independiente) la fragmentación de DNA y la condensación de cromatina.

Como se ha mencionado previamente, tanto las señales de muerte intrínsecas como las extrínsecas pueden ser transmitidas a la mitocondria por translocación de miembros de la familia de Bcl-2 desde diferentes compartimentos celulares. En este sentido, algunas de las señales de muerte extracelulares mediadas a través del ligando Fas activan la caspasa-8 intracelularmente, que en su forma activa rompe y activa a Bid, que transloca hacia la mitocondria donde induce la liberación de citocromo c, amplificando la señal de activación vía caspasas (véanse figuras 1 y 6; Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Por otro lado, las señales de supervivencia extracelulares inhiben la apoptosis por activación de la vía de la fosfatidilinositol-3 quinasa/Akt, que conlleva a la fosforilación de Bad (miembro pro-apoptótico). La proteína Bad fosforilada se une a la proteína 14-3-3 y permanece secuestrada en el citoplasma, mientras que la forma desfosforilada transloca a la mitocondria (Zha *et al.*, 1996). Otro miembro pro-apoptótico como es la proteína Bax también transloca del citoplasma a la mitocondria durante la apoptosis (Wolter *et al.*, 1997). Por tanto, las señales apoptóticas deben activar la translocación de estos factores hacia la mitocondria, provocando así la liberación de citocromo c, e induciendo la activación de las caspasas pertinentes.

Cabe mencionar que los dominios de muerte se denominaron así, en un inicio, para reflejar la habilidad de para acoplar el receptor Fas con las vías apoptóticas. Sin embargo, los DD pueden iniciar otras vías de señalización, resultando en proliferación o supervivencia en vez de muerte. Por ello, el término ‘dominio de muerte’ puede ser tan confuso como el término ‘receptor de muerte’ ya que tanto el receptor por sí mismo como su dominio de muerte intracelular pueden transducir múltiples tipos de señales (Lambert *et al.*, 2003).

APOPTOSIS EN EL SISTEMA NERVIOSO

La historia vital de todas las neuronas se desarrolla a lo largo de varios niveles neurogenéticos que incluyen la inducción, diferenciación, proliferación, migración, y la formación de vías axonales y de conexiones sinápticas, para conferir eventualmente una función específica fisiológica a cada neurona. Sin embargo, en muchas partes del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP), se estima que al menos la mitad de la población original de células se elimina como resultado de fenómenos de apoptosis ocurridos durante el desarrollo del sistema nervioso (Oppenheim, 1981; Burek y Oppenheim, 1996). Esta enorme pérdida es una característica común para muchos tipos de neuronas (motoras, sensoriales, interneuronas, autonómicas, etc.), ocurre en todos los vertebrados, y parece ser el mecanismo adaptativo más importante del sistema nervioso durante el desarrollo (Oppenheim, 1991). Sin embargo, una manera de regulación específica en diferentes tipos de neuronas así como en neuronas a distintos niveles de desarrollo es la expresión de diferentes combinaciones de miembros de la familia de Bcl-2 y de caspasas. Ya se ha mencionado que la muerte inducida por activación de Fas en el sistema nervioso (Felderhoff-Mueser *et al.*, 2000) comparte el mismo programa básico de apoptosis que el resto de tipos celulares (Sastry y Rao, 2000; Yuan y Yankner, 2000).

La apoptosis neuronal también puede jugar un papel importante en la patología de ciertas enfermedades degenerativas del SNC. Muchas enfermedades neurológicas se caracterizan por la pérdida gradual de lotes específicos de neuronas dando lugar a desarreglos en el movimiento y en la función del SNC. El papel potencial de la apoptosis durante el desarrollo neuronal incluye la optimización de las conexiones sinápticas, la eliminación de neuronas innecesarias, y su patrón de formación (Burek y Oppenheim, 1996). La oportunidad que tiene una neurona durante el desarrollo para sobrevivir se cree que es directamente dependiente a la extensión de sus conexiones con dianas postsinápticas, lo que sugiere una sobre-producción inicial de neuronas y una posterior competencia sobre dianas derivadas de factores neurotróficos (Cowan *et al.*, 1984). Las neuronas también reciben soporte trófico de las células gliales, de las células presinápticas, y de hormonas esteroideas (Lindsay, 1979; Okado y Oppenheim, 1984; Nordeen *et al.*, 1985; Linden, 1994). Por último, ciertos fenómenos de neurotoxicidad inducidos por diversos agentes y fármacos también podrían relacionarse con una modulación y activación de proteínas apoptóticas (Sastry y Rao, 2000).

FÁRMACOS OPIÁCEOS

El opio o jugo extraído de la adormidera *Papaver somniferum* es uno de los agentes con actividad farmacológica más antiguo conocido por los humanos y está compuesto por una mezcla de azúcares, proteínas, grasas, gomas, ácido láctico y sulfúrico y por numerosos compuestos con más de 20 alcaloides activos diferentes. En 1806, Sertürner consiguió aislar por primera vez una muestra cristalina del principal constituyente alcaloide del opio, al que denominó morfina (para señalar su poder sedante y al dios del sueño Morpheus). La morfina es la responsable de la actividad analgésica del opio crudo, mientras que los efectos colaterales indeseables del opio son los responsables del desarrollo de adicción durante su uso crónico. Una vez aislada la morfina, prosiguió el descubrimiento de otros alcaloides presentes en el opio, como fue el caso de la codeína descubierta por Robiquet en 1832, o de la papaverina aislada por Merck en 1848.

El uso moderno de los opiáceos como una droga de abuso surgió en los EE.UU. de América como consecuencia de varios factores. El primer detonante fue el fácil acceso a la droga, que permaneció legal y de fácil disponibilidad hasta principios del siglo XX, sumado a la moda instaurada por el gran influjo de inmigrantes fumadores de opio desde Oriente. La posterior invención de las agujas hipodérmicas conllevó al uso parenteral de la morfina y a la aparición de una variedad más severa de adictos compulsivos al fármaco. El problema de la adicción a opiáceos focalizó la investigación farmacológica hacia la búsqueda de analgésicos potentes libres de este potencial adictivo. Los fármacos de síntesis ampliaron el rango de disponibilidad terapéutico y proporcionaron las herramientas necesarias para explorar las acciones opioides (véase Gutstein y Akil, 2001).

Los opiáceos constituyen un grupo de fármacos que se caracterizan por poseer afinidad selectiva por los receptores opioides. Como consecuencia de la activación de estos receptores inducen analgesia de elevada intensidad, producida principalmente en el SNC, así como otros efectos subjetivos que tienden a favorecer la instauración de una conducta de autoadministración denominada farmacodependencia. Se suelen utilizar de forma indistinta los términos opiáceo y opioide. Sin embargo, en sentido estricto el término opiáceo se emplea para designar a los fármacos derivados del opio, incluyendo la morfina, codeína, y una amplia variedad de congéneres semi-sintéticos derivados de ellos y de la tebaína, otro componente del opio. Por otro lado, el término opioide, más inclusivo, engloba todos los

agonistas y antagonistas con actividad tipo morfina así como los péptidos opioides sintéticos (Gutstein y Akil, 2001).

RECEPTORES OPIOIDES

En 1954 Beckett y colaboradores propusieron la existencia de receptores específicos para los fármacos opiáceos en base a la rigidez estructural y los requerimientos estereoquímicos esenciales necesarios para mediar las acciones analgésicas de la morfina y de los opiáceos relacionados. Estos receptores se empezaron a denominar como “opioides” cuando, mucho más tarde, se conoció que sus ligandos endógenos eran péptidos con efectos similares a aquellos de los fármacos opiáceos. En 1965, Portoghese y colaboradores, mediante la realización de estudios de la relación estructura química-actividad, fueron los primeros en sugerir la existencia de más de un tipo de receptor opioide o de múltiples modos de interacción entre los ligandos y estos receptores. En 1973 se describieron por primera vez en cerebro lugares de unión estereoespecíficos y de elevada afinidad para los fármacos opiáceos. Una vez confirmada la presencia de receptores específicos para los alcaloides opiáceos y sus fármacos sintéticos relacionados, se procedió a la búsqueda de posibles ligandos endógenos para estos receptores y al descubrimiento de las encefalinas, β -endorfinas, y dinorfinas (Gutstein y Akil, 2001).

En 1976, Martin y colaboradores, mediante la utilización de un modelo que permitía discriminar la acción del fármaco sobre varias respuestas reflejas en la médula espinal de perro, presentaron la primera evidencia definitiva de que estos receptores no formaban una población homogénea. Las formas propuestas de receptor se denominaron según los agonistas prototipo utilizados en el estudio: el receptor μ , de morfina y el receptor κ , de ketociclazocina (Martin *et al.*, 1976). En el intento de explicar el perfil de actividad *in vitro* de los primeros péptidos opioides endógenos, las encefalinas, se sugirió la existencia del receptor δ -opioide. Estos estudios se basaron en la potencia relativa de la naloxona, un antagonista opioide no selectivo, para revertir la inhibición provocada por el péptido opioide endógeno sobre las contracciones inducidas en el conducto deferente de ratón (δ , de deferente) (Lord *et al.*, 1977). La propuesta inicial que sugería la existencia de tres tipos de receptores opioides (μ , δ , κ) fue posteriormente confirmada, primero con estudios de unión de radioligandos a estos receptores y más recientemente con la clonación y caracterización de los genes que codifican para estos receptores (Evans *et al.*, 1992; Minami *et al.*, 1993; Gutstein y Akil, 2001; véase también “International Union of Pharmacology, Opioid Receptors” en www.iuphar.org).

Receptor μ -opioide (NC-IUPHAR: receptor MOP)

El receptor μ -opioide, en un inicio, se definió y caracterizó farmacológicamente en base a la elevada afinidad y sensibilidad que presentó por la morfina. Hasta el momento no se habían establecido ligandos endógenos específicos, aunque eran muchos los péptidos opioides endógenos que interactuaban con cierta afinidad con los receptores μ -opioides, como [Met⁵]-encefalina, [Leu⁵]-encefalina, las formas extendidas de [Met⁵]-encefalina, incluyendo metorfamida y BAM-18, la β -endorfina, y algunas formas truncadas de la dinorfina, como la dinorfina-A que además de unirse a receptores μ -opioides también se unía, y de forma más potente, con los receptores κ -opioides. Posteriormente, algunos grupos de investigación consiguieron identificar morfina endógena en cerebro, a la que denominaron endomorfina-1 y -2, que además parecía mediar sus efectos exclusivamente a través del receptor μ -opioide por lo que se sugirió como un ligando natural para este sitio de unión. El subsiguiente desarrollo de agonistas altamente selectivos para estos receptores, así como de antagonistas (véase tabla 1), sirvió para ayudar a caracterizar y definir las acciones farmacológicas mediadas por el receptor. Los receptores μ -opioides se distribuyen en el SNC a través del neuroeje, encontrándose las mayores densidades en el tálamo, caudado/putamen, neocortex, núcleo accumbens, amígdala, complejo interpeduncular, y el colículo inferior y superior. Los receptores μ -opioides, así como los δ - y κ -opioides, están presentes en las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal. Sin embargo, en el núcleo periaqueductal y en los núcleos del rafe sólo se encuentran densidades moderadas de estos receptores. Las distintas regiones cerebrales tienen un papel bien establecido en la mediación del dolor y la analgesia. Los receptores μ -opioides también regulan otras funciones fisiológicas como serían las funciones respiratoria y cardiovascular, el tránsito intestinal, el comportamiento, la termorregulación, hormona de secreción y las funciones inmunes. En un intento de comparar si la distribución de los receptores μ -opioides es homogénea entre las distintas especies animales, se observó que en cerebro de ratón la distribución es similar a la mostrada para rata, aunque con algunas diferencias cuantitativas en algunas regiones.

Receptor δ -opioide (NC-IUPHAR: receptor DOP)

Las encefalinas se consideran los ligandos endógenos preferidos del receptor δ -opioide, denominado así por ser caracterizado inicialmente en experimentos en el conducto deferente de ratón. Hasta el momento, se han sintetizado muchos agonistas y antagonistas con elevada

afinidad y selectividad por estos receptores (véase la tabla 1). Los receptores δ -opioides se encuentran distribuidos de forma moderada en el SNC, formando un gradiente de densidades de receptores desde niveles elevados en estructuras del cerebro anterior a niveles relativamente bajos en la mayoría de regiones del cerebro medio. En el bulbo olfativo, el neocortex, el caudado/putamen, el núcleo accumbens, y la amígdala se encuentran densidades mayores, mientras que el tálamo e hipotálamo contiene densidades moderadas. Las funciones principales de los receptores δ -opioides son mediar los efectos analgésicos de los agonistas δ , un posible papel en la motilidad gastrointestinal, en el humor y comportamiento, así como en la regulación cardiovascular.

Receptor κ -opioides (NC-IUPHAR: receptor KOP)

Los ligandos endógenos para los receptores κ -opioides son la dinorfina A y B y la α -neoendorfina (véase tabla 1). Los receptores κ -opioides están localizados de forma predominante en la corteza cerebral, en el núcleo accumbens, en el claustrum y en el hipotálamo de rata y ratón, y se han implicado en la regulación de la nocicepción, diuresis, alimentación, y en las funciones del sistema inmune y neuroendocrino.

Receptor de nociceptina (NC-IUPHAR: receptor NOP)

El receptor NOP fue identificado por clonación homóloga como un “receptor huérfano”, el ORL₁ (*opioid receptor-like*) (Mollereau *et al.*, 1994). Actualmente, el único ligando endógeno establecido para este receptor es el propio N/OFQ (nociceptina/orfanina FQ). Ninguno de los péptidos opioides endógenos previamente identificados derivados de los genes proencefalina, prodinorfina o pro-opiomelanocortina presentaron afinidad o eficacia significativa por este receptor. Los receptores NOP se encuentran en ciertas regiones de la corteza de rata con una densidad bastante elevada como en el núcleo olfativo anterior, en el septo lateral, en el cerebro anterior ventral, hipocampo, hipotálamo, amígdala, sustancia negra, área ventral del tegmento, locus coeruleus, en núcleos del tronco encefálico y en el asta dorsal de la médula espinal. También se encuentran en células del sistema inmune. Esta distribución difusa sugiere la implicación de este sistema en varias funciones que incluirían el comportamiento motor y agresivo, el refuerzo y la recompensa, la nocicepción, la respuesta al estrés, y el control de las funciones autonómica y inmune.

Otros receptores

Cuando en 1976 Martin y colaboradores describieron la heterogeneidad de los receptores opioides (μ y κ ; Martin *et al.*, 1976), también propusieron otro tipo de receptor opioide, el

receptor σ (activado por SKF-10047 o N-alilnormetazocina). Sin embargo, este receptor ha dejado de ser considerado como opioide ya que, entre otras diferencias, la naloxona no es capaz de actuar como un antagonista sobre el mismo (Quirion *et al.*, 1992).

En base a propiedades farmacológicas que parecen incompatibles con las características bien definidas de los receptores μ , δ , κ , se han postulado nuevos tipos de receptores opioides (ϵ , λ , τ , ξ), a pesar de no estar tan bien caracterizados.

Se ha especulado con la existencia de subtipos de receptores μ , δ y κ -opioides, sin embargo, no hay evidencias que sugieran que estos subtipos sean los productos de genes de receptores opioides adicionales. El posible papel de un procesamiento (“splicing”) alternativo del mRNA o de posibles procesamientos post-translacionales sobre estas formas de receptor está aún por determinar. Se han establecido formas alternativas de procesamiento del transcripto del gen del receptor μ , pero lo que no está claro es si las funciones de estas proteínas son significativamente diferentes. Por el contrario, se cree que estas formas alternativas de procesamiento sí provocan diferencias con respecto al grado de internalización y/o reciclado del receptor. También es posible que el ambiente celular en el que el gen del receptor se expresa inflencie la función del producto génico de manera tejido- y estímulo-específica. Además, estudios recientes han demostrado que los receptores opioides, al igual que otros receptores acoplados a proteínas G (Franco *et al.*, 2005), pueden formar homo- o heterodímeros funcionales cuando se co-expresan en células en cultivo. Se sabe que las propiedades funcionales de las formas heterodiméricas difieren significativamente de las propiedades de cualquiera de los monómeros por separado. Sin embargo, aún queda por determinar si la evidencia farmacológica de la existencia de subtipos de receptores opioides podría ser explicado en su totalidad o en parte por la presencia de heterodímeros funcionales de los principales tipos de receptores opioides.

Características de los receptores opioides

Los receptores opioides, como era de prever por sus acciones bioquímicas, pertenecen al grupo de receptores de membrana asociados a proteínas G con siete segmentos transmembrana. Como se acaba de mencionar, y al igual que ocurre con otros receptores asociados a proteínas G, los receptores δ y κ -opioides pueden formar homodímeros y heterodímeros. La homología de secuencia aminoacídica entre los tres tipos principales de receptores opioides alcanza hasta un 60% en su conjunto, si bien existen regiones en las que la homología es mayor, como es el caso de los segmentos hidrófobos transmembrana (66%)

y el de los bucles intracelulares, particularmente el segundo y el tercero (más de un 80%). Los receptores opioides presentan varios sitios de glicosilación en el segmento N-terminal (véase figura 8), uno de palmitoilación, además de varios sitios de fosforilación en el tercer bucle intracelular y en el segmento C-terminal. La reacción de fosforilación, como ocurre con otros receptores, puede estar relacionada con mecanismos de desensibilización. El tercer bucle intracelular interviene probablemente en los procesos de acoplamiento con las proteínas G.

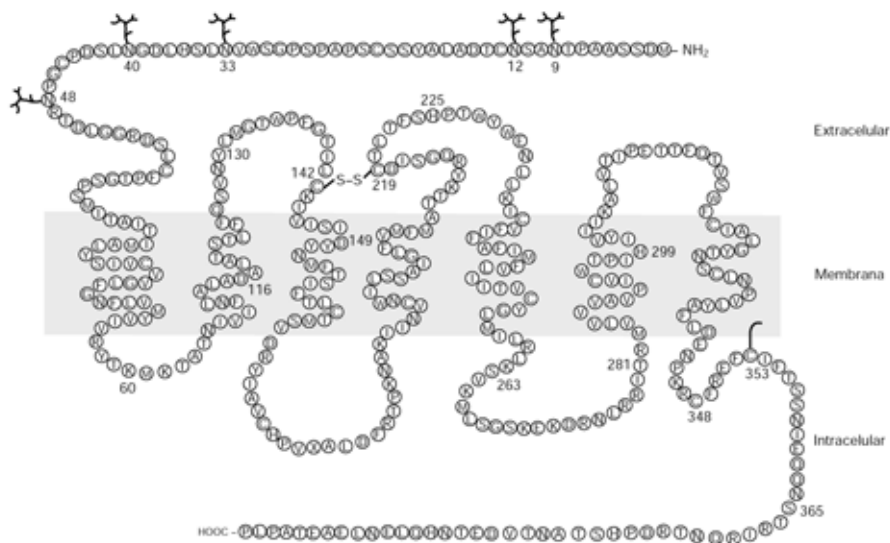


Figura 8. Receptor μ -opioide humano. Los residuos 9, 12, 33, 40 y 48 son sitios de glicosilación. Los residuos 263, 281 y 365 son sitios posibles de fosforilación.

En la tabla siguiente se exponen las características más importantes de los distintos tipos de receptores opioides, su relación con sistemas efectores celulares así como sus ligandos específicos naturales y sintéticos (véase tabla 1).

Tabla 1. Receptores opioides: características y principales ligandos (NC-IUPHAR).

	μ	δ	κ	NOP
Nomenclatura previa	OP ₃	OP ₁	OP ₂	OP ₄ , ORL1, LY322
Propuesta actual	μ , mu, o MOR	δ , delta, o DOR	κ , kappa, o KOR	NOP
Código del receptor	2.1:OP:1:M	2.1:OP:2:D	2.1:OP:3:K	2.1:OP:4:N
Estructura	humano: 400 aa. rata: 398 aa. ratón: 398 aa.	humano: 372 aa. rata: 372 aa. ratón: 372 aa.	humano: 380 aa. rata: 380 aa. ratón: 380 aa.	humano: 370 aa. rata: 367 aa. ratón: 367 aa.
Localización cromosomal	humano: 6q24-25	humano: 1p34.3-36.1	humano: 8q11.12	ratón: 2
Sitios de glicosilación	4-5	2	2	
Palmitoilación	sí	sí	sí	
Ligandos endógenos	β -endorfina (no selectivo) encefalinas (no selectivo) endomorfina-1 endomorfina-2	encefalinas (no selectivo) β -endorfina (no selectivo)	dinorfina A dinorfina B α -neoendorfina	nociceptina/ orfanina FQ (N/OFQ)
Ligandos exógenos				
Selectivos				
Agonistas	DAMGO morfina metadona sufentanilo dermorfina	DPDPE DSLET DTLET SNC-80 deltorfina	espiradolina U58488 U69593 U50488H	Ro646198
Antagonistas	CTAP (pKi=8.4)	naltrindol (NTI) (pKi=9.7)	nor-binaltorpimina (pKi=10.3)	J113397 (pKi=8.6)
No selectivos				
Agonistas	levorfanol etorfina	levorfanol etorfina	levorfanol etorfina etilketociclazocina	
Antagonistas	naloxona naltrexona β -funaltrexamina	naloxona naltrexona	naloxona naltrexona	
Sistema efector G α_i /G α_o	↓ AMP _C ↑ MAPK (en sistemas heterólogos) ↓ Ca ²⁺ neuronal (canales Ca ²⁺ , tipo-N) ↑ canal K ⁺ (en varias regiones cerebrales)	↓ AMP _C ↑ MAPK (en sistemas heterólogos) ↓ Ca ²⁺ neuronal (canales Ca ²⁺ , tipo-N) ↑ canal K ⁺ (en varias regiones cerebrales)	↓ AMP _C ↑ MAPK (en sistemas heterólogos) ↓ Ca ²⁺ neuronal (canales Ca ²⁺ , tipo-N) ↑ canal K ⁺ (en varias regiones cerebrales)	↓ AMP _C ↑ MAPK (en sistemas heterólogos) ↓ Ca ²⁺ neuronal (canales Ca ²⁺ , tipo-N) ↑ canal K ⁺ (en varias regiones cerebrales)
Sistema efector G β_i /G β_o	↑ AMPc ↑ PLC y Ca ²⁺	↑ AMPc ↑ PLC y Ca ²⁺	↑ AMPc ↑ PLC y Ca ²⁺	

Afinidades por los receptores opioides de los fármacos utilizados en este estudio

En la tabla 2 se muestran las afinidades por los receptores opioides de los fármacos opiáceos (μ -, δ - y κ -selectivos) utilizados en este estudio.

Tabla 2. Fármacos opiáceos y afinidades por los receptores opioides.

	Receptor μ -opioide, [³ H] DAMGO	Receptor δ -opioide, [³ H] naltrindol	Receptor κ -opioide, [³ H] U-69593
Compuestos μ-selectivos			
Metadona	0.72	>1000	>1000
Morfina	14	>1000	538
Sufentanilo	0.15	50	75
Compuestos δ-selectivos			
SNC-80	>1000	1.7	-
Naltrindol	64	0.02	66
Compuestos κ-selectivos			
U-50488	>1000	>1000	0.12
Norbinaltorpimina	2.2	65	0.027
Compuestos no selectivos			
(-)-Naloxona	0.93	17	2.3
Pentazocina	5.7	31	7.2

Constantes de inhibición (K_i , nanomolar) frente al radioligando utilizado tras la expresión celular del clon del receptor (Raynor et al., 1994).

ADICCIÓN A OPIÁCEOS

La adicción a opiáceos en humanos es un proceso crónico caracterizado por el desarrollo de tolerancia y dependencia (física y química) al fármaco, así como por una especial sensibilización al opiáceo que induce vulnerabilidad frente a las recaídas, y además presenta una elevada mortalidad. El desarrollo de la adicción a opiáceos implica una serie de cambios adaptativos en los receptores opioides del cerebro (mayormente representados para el receptor μ -opioide) y en sus sistemas de regulación (e.g., GRKs/ β -arrestina) y señalización (e.g., vía de la adenilatociclasa) asociados, lo que conlleva a una alteración de la plasticidad neuronal en regiones específicas del cerebro, incluido el neocortex (véanse procesos moleculares relacionados en Simonato, 1996; Nestler y Aghajanian, 1997; Law *et al.*, 2000; Nestler, 2001, 2002; Williams *et al.*, 2001) (revisado de forma básica en O'Brien, 2001).

El principal circuito neuronal implicado en la adicción y en la recompensa tras la ingesta de la droga es el que involucra neuronas que contienen dopamina en el área ventral tegmental (VTA) del cerebro medio y sus áreas diana en el cerebro límbico anterior, en particular el núcleo accumbens (NAc) y las regiones frontales de la corteza (Nestler, 2004; véase figura 9). De hecho, la vía VTA-NA parece ser el punto donde virtualmente convergen todas las drogas de abuso para producir sus señales de recompensa aguda. Las drogas de abuso pueden incrementar la transmisión mediada por dopamina en el NAc o bien actuar directamente en neuronas del NAc por mecanismos independientes de dopamina.

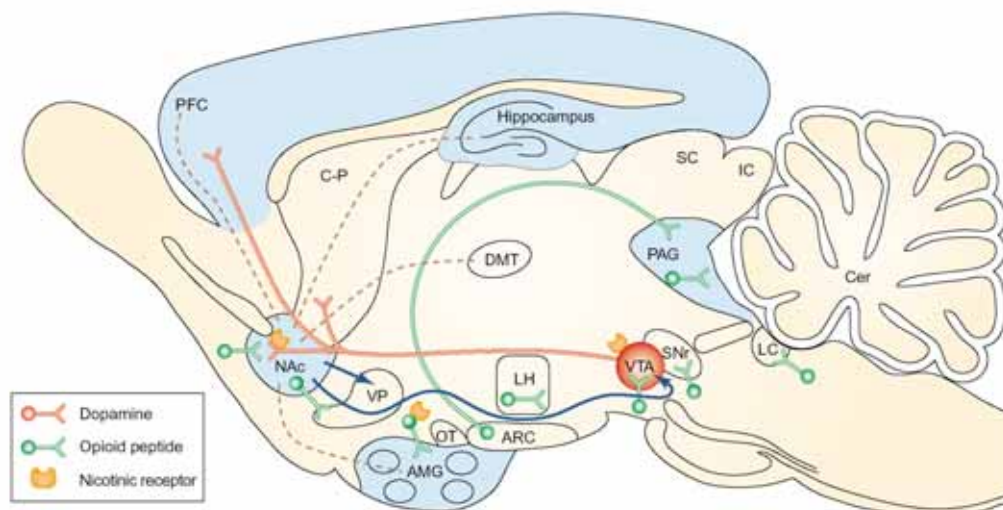


Figura 9. Circuitos neuronales clave de la adicción.

Las líneas punteadas muestran las aferencias límbicas al núcleo accumbens (NAc). Las flechas azules representan las eferencias del NAc (posiblemente implicadas en el fenómeno de recompensa de la droga). Las proyecciones del sistema mesolímbico dopaminérgico (posible sustrato crucial para la recompensa de la droga) se muestran en rojo. Este sistema se origina en el área ventral tegmental (VTA) y proyecta al NAc y

otras estructuras límbicas, incluida la corteza prefrontal (PFC), dominios ventrales del caudado putamen (C-P), el tubérculo olfativo (OT) y la amígdala (AMG) (no se muestran las proyecciones a OT y AMG). En verde se muestran las neuronas que contienen péptidos opioides y están involucradas en la recompensa que provoca la ingestión de opiáceos, etanol y, posiblemente, nicotina. Estos sistemas de péptidos opioides incluyen los circuitos locales encefalinérgicos (segmentos cortos) y el circuito β -endorfina del cerebro medio hipotalámico (segmento largo). Las áreas azul claro corresponden a la distribución de los complejos del receptor GABA_A (posible contribución a la recompensa de etanol). También se muestran los receptores nicotínicos de acetilcolina, posiblemente localizados en neuronas que contienen tanto dopamina como péptidos opioides. Abreviaturas: ARC, núcleo arcuato; Cer, cerebelo; DMT, tálamo dorsomedial; IC, colículo inferior; LC, locus coeruleus; LH, hipotálamo lateral; PAG, sustancia gris periaqueductal; SC, colículo superior; SNr, sustancia negra pars reticulata; VP, pálido ventral.

(Tomado de Nestler, 2004)

Las bases celulares de la tolerancia y dependencia generada hacia varios tipos de fármacos, incluidos los opiáceos, requieren aún una completa identificación. La tolerancia a opiáceos no se puede explicar sólo en base a modificaciones en los receptores opioides, a una alteración del metabolismo o en base a la disposición del opiáceo. La tolerancia celular también puede resultar de alteraciones en el acoplamiento del receptor, del número de receptores, de la cantidad de proteína efectora o de la capacidad de un efector de ser regulado por los receptores opioides. Las diferentes formas de tolerancia se distinguen por el tiempo que tardan en desarrollarse y por si la tolerancia es o no específica de los agonistas de los receptores opioides (regulación homóloga) o se extiende a agonistas de otro sistema (regulación heteróloga). Así, la tolerancia a los efectos analgésicos y reconfortantes de los opiáceos se desarrolla en cuestión de horas/días hasta semanas, así como también se desarrolla dependencia física y psicológica (que contribuye a la disforia y al elevado índice de recaídas durante las fases tempranas de la abstinencia), y el fenómeno de sensibilización (que contribuye al incremento en el riesgo de recaídas después de períodos largos de abstinencia). Se ha propuesto que la modulación adaptativa a través de la regulación de proteínas intracelulares podría ser la base de las formas de tolerancia a corto y largo plazo (Taylor y Fleming, 2001). Los receptores opioides pueden activar distintos eventos de señalización a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G, lo que ofrece un gran abanico de posibles explicaciones para la interacción entre estas diferentes formas de tolerancia y/o dependencia. En esta línea, se han identificado algunos de los mecanismos moleculares y celulares o adaptaciones posibles involucrados en la adicción a opiáceos, como los cambios producidos a nivel transcripcional, a nivel post-transcripcional y a nivel de la regulación de las estructuras sinápticas tras la exposición crónica a opiáceos. Por tanto, los mecanismos de adaptación incluyen la desensibilización del receptor vía fosforilación y endocitosis y vía alteración de la expresión génica. En el fenómeno de tolerancia aguda la endocitosis está regulada por varios pasos de fosforilación, como la PKC (proteína quinasa

C) y las GRK (quinasas de receptores acoplados a proteínas G). Este mecanismo de tolerancia implicaría la fosforilación de receptores, y su secuestro e internalización. En la desensibilización homóloga la unión del ligando al receptor conlleva a la fosforilación por alguna proteína quinasa de los receptores acoplados a proteínas G (GRK). El receptor fosforilado se desacopla de la proteína G, se asocia con una arrestina (Pierce y Lefkowitz, 2001), y sufre internalización endocítica (vesículas recubiertas de clatrina) a través de un proceso dependiente de dinamina (revisado en Tegeder y Geisslinger, 2004). El receptor permanece cierto tiempo internalizado, para luego o bien ser desfosforilado y recirculado a la membrana plasmática, o bien ser degradado por la acción de ciertas proteasas. El sistema GRK-arrestina se ha implicado directamente con la tolerancia a opiáceos (véase Nestler, 2001). La endocitosis de los receptores opioides se concibe como un paso de reciclado y resensibilización en vez de un paso de desensibilización. En la desensibilización heteróloga, la fosforilación inicial es mediada a través de varias proteínas quinasas activadoras de segundos mensajeros como son la PKC, CaMK-II, MAPK y proteínas tirosina quinasas (revisado en Tegeder y Geisslinger, 2004). La fosforilación por PKC inhibe la endocitosis, por lo que la inhibición de la PKC atenúa la tolerancia analgésica. En este sentido, se sabe que la morfina causó una rápida desensibilización del receptor MOR en algunos sistemas celulares pero no en otros, y que esta variabilidad podría ser consecuencia de la activación o expresión diferencial de proteínas quinasas en los diferentes tipos celulares (véase Bailey y Connor, 2005). La relación entre los procesos de desensibilización, internalización y tráfico de receptores MOR y el desarrollo de tolerancia celular en neuronas no está aún bien definido. Sin embargo, se cree que los mecanismos de desensibilización aguda y resensibilización del receptor son alterados por la administración crónica de morfina en animales, ya que la recuperación de las respuestas MOR en neuronas del LC tras un estímulo de desensibilización aguda es menor y menos completa en neuronas de animales tratados con morfina que en los respectivos controles (Dang y Williams, 2004).

Por otro lado, el fenómeno de tolerancia crónica está más relacionado con los mecanismos asociados con la modulación plástica de los circuitos neuronales. En esta línea, se ha propuesto que incrementos en los sistemas anti-opioidérgicos (neuronas anti-opioidérgicas) podrían contribuir al desarrollo de tolerancia y dependencia a morfina, y que estas contribuciones pudieran ser específicas de la región cerebral en la que ocurren (Ueda, 2004). Los cambios a largo plazo en la expresión de receptores sugieren una alteración persistente de la señalización sináptica después del tratamiento con morfina. La exposición

crónica a opiáceos puede conducir a una alteración de la expresión génica, lo que conllevaría a alterar la actividad de las neuronas en las que esos cambios ocurran y, por último, a provocar cambios en los circuitos neuronales en los que esas neuronas operen. Las consecuencias podrían ser cambios estables de comportamiento (véase Nestler, 2001). Hasta el momento se han implicado principalmente dos factores de transcripción en la adicción a opiáceos: el CREB y Δ FosB (véase Nestler, 2001). Además, en los últimos años se ha documentado que la exposición crónica a opiáceos causa cambios estructurales en tipos específicos de células neuronales. En este sentido se observó que la exposición crónica con opiáceos redujo la expresión de nuevas neuronas en el hipocampo adulto (Eisch *et al.*, 2000). Se ha podido demostrar que la adicción a opiáceos, tanto en animales de experimentación como en el hombre, se asocia con alteraciones mayores del citoesqueleto de las neuronas (contenido y grado de fosforilación de los neurofilamentos) que bien podrían reflejar un proceso de neurotoxicidad y/o cambios plásticos relacionados con los procesos moleculares de adicción (Boronat *et al.*, 1998; Robinson y Kolb, 1999; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000, 2003). Una alteración de la plasticidad neuronal podría reflejarse en cambios en la neurotransmisión e incluso en la estructura y el número de conexiones sinápticas formadas por neuronas individuales.

En conclusión, la tolerancia y la adicción a opiáceos se pueden presentar y discutir como tipos de adaptaciones o de cambios en la plasticidad, tanto a nivel celular como a través de los circuitos y comunicaciones neuronales, que podrían ser la causa de las alteraciones de comportamiento asociadas con la dependencia a opiáceos y con el síndrome de abstinencia, así como con la vulnerabilidad frente a las recaídas.

Sistemas post-receptor

Los sistemas post-receptor constituyen un mecanismo principal para comprender los procesos de adaptación neuronal inducidos por la acción de los fármacos opiáceos. A continuación se detallan dos vías de señalización, implicadas en la activación de receptores opioides, que parecen estar alteradas en la adicción a opiáceos: la vía clásica del AMPc y la vía de las quinasas mitogénicas MAP ERK1/2 de reciente involucración. En este trabajo de Tesis doctoral se ha prestado particular atención a la cuantificación de los componentes de estas vías en cerebros de adictos a opiáceos.

Vía del AMPc

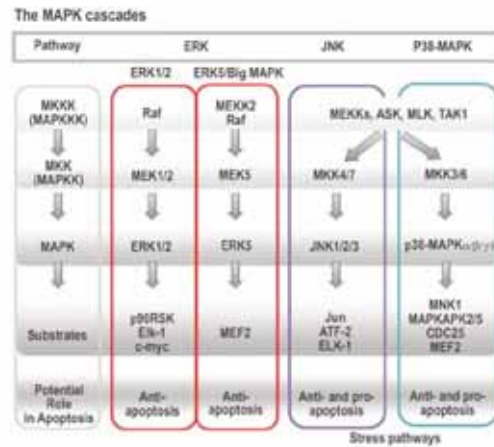
La adaptación molecular mejor establecida tras la administración crónica de morfina es un incremento en la vía de señalización del AMPc (adenosina monofosfato 3',5'-cíclico) en cerebro de rata. Esta respuesta se desarrolla probablemente para compensar el efecto agudo del opiáceo que consistía en inhibir la vía (Nestler y Aghajanian, 1997). En el locus coeruleus de rata, el incremento en la señalización del AMPc es concomitante con incrementos en la concentración de las proteínas Gi/o, adenilato ciclasas, proteínas quinasa A (PKA) y su diana nuclear CREB (Nestler y Aghajanian, 1997; Williams *et al.*, 2001), que parece jugar un papel importante en mediar un mecanismo de dependencia física y abstinencia a opiáceos en esta región cerebral. La actividad del factor de transcripción CREB jugó un papel importante en la adicción a opiáceos (véase Maldonado *et al.*, 1996; Blendy y Maldonado, 1998), ya que la morfina crónica, a través de la fosforilación de CREB mediada por la proteína PKA, podía estimular la expresión de numerosos genes en el núcleo. Como ya se ha comentado, la modulación de factores de transcripción, como es el caso de CREB, representa un mecanismo de gran relevancia para el desarrollo de ciertas formas de plasticidad inducidas por los opiáceos en el cerebro (véase Nestler y Aghajanian, 1997; Nestler, 2001, 2002, 2004). El incremento en la regulación de la vía del AMPc en neuronas es un mecanismo representativo del desarrollo de tolerancia y dependencia frente a la administración crónica de opiáceos.

Vía de las MAPK

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son una familia de quinasas que transducen señales desde la membrana celular al núcleo en respuesta a un amplio rango de estímulos, incluido el stress (Wada y Penninger, 2004; Fang y Richardson, 2005; Kolch *et al.*, 2005). Las MAPKs son serina/treonina quinasas que, tras estimulación, fosforilan substratos específicos en residuos de serina y/o treonina. Las vías de señalización de las MAPKs modulan la expresión génica, mitosis, proliferación, motilidad, metabolismo y la muerte celular programada o 'apoptosis' (véase Wada y Penninger, 2004; Fang y Richardson, 2005). Existen tres subfamilias principales de MAPK: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK MAPK, Ras/Raf-1/MEK/ERK); las proteínas c-Jun N-terminales o quinasas activadas por stress (JNK o SAPK); y las proteínas p-38 MAPK (véase figura 10).

Figura 10. Vías de señalización de las MAPKs (ERKs, JNKs, y p-38 MAPKs). Sólo se muestran las moléculas de señalización representativas.

(Tomado de Wada y Penninger, 2004)



La vía ERK MAPK es una de las más importantes para la proliferación celular. Varios de los factores clave de crecimiento y proto-oncogenes que transducen las señales que promueven crecimiento y diferenciación lo hacen a través de esta vía (véase Fang y Richardson, 2005). Recientemente, numerosas investigaciones han involucrado la vía de las MAPK con los efectos provocados por los fármacos opiáceos (Law *et al.*, 2000; Liu y Anand, 2001; Williams *et al.*, 2001), aunque la mayoría de los estudios se han centrado únicamente en estudiar la modulación de la quinasa mejor caracterizada de la vía, la ERK1/2 (Ortiz *et al.*, 1995; Berhow *et al.*, 1996; Gutstein *et al.*, 1997; Schulz y Höllt, 1998; Mazzucchelli *et al.*, 2002; Eitan *et al.*, 2003; Lesscher *et al.*, 2003). La vía de las MAPK, como se acaba de mencionar, es un mecanismo de señalización clave que transduce e integra señales extracelulares hasta el núcleo y que regula varios aspectos de las funciones celulares (e.g. crecimiento celular, diferenciación y apoptosis) (Cobb, 1999; Grewal *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2001; Sweatt, 2001). El primer componente de la vía de señalización ERK1/2 (véase figura 10) es la proteína Raf-1 (una serina/treonina quinasa, MAPKKK) que integra la señal extracelular desde el complejo receptor/Ras (una proteína G pequeña) hacia una cascada de quinasas citosólicas por fosforilación y activación de la MEK (MAPKK), que a su vez fosforila y activa, exclusivamente, a ERK1/2 (p44 y p42 MAPK), que finalmente regula varias proteínas citoplasmáticas (e.g., cdk5, proteínas del citoesqueleto) y nucleares (e.g., CREB, Elk-1) y altera la expresión génica (Pearson *et al.*, 2001; Pouyssegur y Lenormand, 2003).

Las quinasas ERK1/2, que se expresan en neuronas maduras, son las quinasas más abundantes de la cascada, lo que proporciona un mecanismo de amplificación de la señal (Derkinderen *et al.*, 1999; Pouyssegur y Lenormand, 2003) que juega un papel relevante en varias formas a largo plazo de plasticidad sináptica (Grewal *et al.*, 1999; Sweatt, 2001; Adams y Sweatt, 2002; Mazzucchelli *et al.*, 2002).

IMPLICACIÓN DE LOS OPIÁCEOS Y OTRAS DROGAS DE ABUSO EN LA APOPTOSIS

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso activo normal de muerte celular durante el desarrollo que también ocurre como consecuencia del efecto citotóxico de varias neurotoxinas (e.g., MPTP/MPP⁺, MDMA, etanol, cocaína) (Sastry y Rao, 2000). En el contexto de las drogas de abuso, se ha demostrado que la cocaína produce un efecto citotóxico directo en el corazón fetal de rata, y también, de manera dosis dependiente, apoptosis en células fetales de miocardio de rata (Xiao *et al.*, 2000). En estudios recientes *in vitro*, la exposición de agonistas de los receptores μ - y/o κ -opioides en cultivos neuronales de cerebro embrionario de pollo (Goswami *et al.*, 1998) y en líneas celulares específicas (Dawson *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997; Singhal *et al.*, 1998; 1999) incrementó su vulnerabilidad frente a la muerte celular por mecanismos apoptóticos.

Como se supone que las interacciones célula-matriz juegan un papel importante en la apoptosis, específicamente en la regulación de la apoptosis dependiente de proteínas de anclaje, un desajuste en las proteínas que conforman el citoesqueleto neuronal podría inducir citotoxicidad y muerte celular apoptótica (Kothakota *et al.*, 1997; Abbracchio *et al.*, 1999). En esta línea, los fármacos opiáceos administrados de forma crónica pueden inducir daño en la estructura de las neuronas, concretamente en las proteínas que conforman el citoesqueleto neuronal (véase Nestler, 1996; García-Sevilla *et al.*, 1997; Büttner *et al.*, 2000; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000). Así, el tratamiento crónico con morfina en ratas redujo marcadamente las inmunodensidades de las proteínas de los neurofilamentos (NF-L, el principal filamento intermedio del citoesqueleto neuronal), en varias regiones cerebrales relevantes en la adicción a opiáceos (Beitner-Johnson *et al.*, 1992; Boronat *et al.*, 1998; Jaquet *et al.*, 2001; resultados de este trabajo de Tesis). Además, las inmunodensidades de las formas no fosforiladas del NF también se encontraron disminuidas en cerebros *postmortem* de adictos crónicos a heroína (García-Sevilla *et al.*, 1997; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000), demostrándose también la existencia de una hiperfosforilación anormal tanto de NF-H como de NF-M en cerebros de adictos a opiáceos (Ferrer-Alcón *et al.*, 2000) así como en cerebros de ratas dependientes de morfina (Jaquet *et al.*, 2001). La administración crónica de opiáceos también puede provocar cambios en la morfología cerebral a varios niveles: disminuyó el volumen cerebral (Pezawas *et al.*, 1998); redujo el tamaño y el calibre de dendritas y soma de neuronas dopaminérgicas mesolímbicas (Sklair-Tavron *et al.*, 1996) y disminuyó el

número de espinas dendríticas de neuronas de varias regiones cerebrales (Robinson y Kolb, 1999; Liao *et al.*, 2005).

Por otra parte, y con especial referencia a este trabajo de Tesis, la morfina es capaz de potenciar la inducción de apoptosis en linfocitos (Singhal *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 1999). Los efectos de inhibición del crecimiento o inductores de apoptosis de la morfina en neuronas y varias células inmunológicas se han asociado directamente con la tolerancia a morfina (Wu *et al.*, 1999; Mao *et al.*, 2002) o con la desensibilización del receptor, como se observó tras una falta de estimulación de actividad GTPasa por la morfina a concentraciones que normalmente inhiben el crecimiento tumoral (Tegeder *et al.*, 2003). Los fármacos que previnieron el desarrollo de tolerancia a morfina en ratas también previnieron la muerte celular y viceversa (Mao *et al.*, 2002). Esta asociación entre la apoptosis y la desensibilización de receptores opioides sugiere que el desacoplamiento del receptor de la proteína Gi o la internalización del receptor en vez de la activación Gi pudieran ser el elemento clave en la iniciación de la muerte celular o parada del ciclo celular evocada por opioides, y ponen de manifiesto una conexión entre la activación de receptores opioides y los eventos de señalización que median la apoptosis celular *in vitro*. A partir de trabajos del grupo (García-Sevilla *et al.*, 1997; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000) y de la asociación de muerte celular inducida por morfina en células periféricas (Yin *et al.*, 1999), se consideró de gran interés explorar la modulación de proteínas apoptóticas en la adicción a opiáceos teniendo como diana el cerebro de roedores y utilizando experimentos *in vivo*, así como cerebros de adictos a opiáceos que murieron por una sobredosis mortal.

EL SISTEMA FAS/FADD COMO TRANSDUCTOR DE SEÑALES NO APOPTÓTICAS. CONEXIONES CON LA VÍA MAPK ERK1/2

Junto al comentado papel primario de Fas/Fas-L en la apoptosis, estudios recientes han demostrado que este sistema también puede funcionar, según las circunstancias, como un señalizador celular no apoptótico (Wajant, 2002; Pettmann y Henderson, 2003). Por ejemplo y con referencia al sistema nervioso central, el receptor Fas estimula el crecimiento axonal en neuronas primarias (Desbarats *et al.*, 2003). Estos resultados fueron totalmente inesperados, ya que la inducción de muerte celular era la única función conocida de Fas hasta ese momento (Pettmann y Henderson, 2003). En cuanto a otras funciones no apoptóticas descritas, el receptor Fas transdujo señales proliferativas en fibroblastos diploides humanos y en células T (Siegel *et al.*, 2000), medió hipertrofia del cardiomiocito *in vitro e in vivo* (Badorff *et al.*, 2002), mientras el Fas-L facilitó la adquisición del antígeno en las células de melanomas (Tada *et al.*, 2002). Además se demostró la relevancia de este sistema en la regulación del crecimiento celular y la diferenciación (Budd, 2002; Tibbetts *et al.*, 2003) (véanse figuras 11 y 12) y en respuestas regenerativas en neuronas (véase Lambert *et al.*, 2003).

Estas funciones no apoptóticas para el sistema Fas/FADD, y sus mecanismos, están todavía por aclarar completamente aunque se cree que podrían involucrar la activación de la vía MAPK/ERK1/2, que parece jugar un papel importante en mediar las señales anti-apoptóticas en las células (Holmström *et al.*, 1999, 2000; Wada y Penninger, 2004). En este sentido se ha observado que los receptores de muerte también pueden promover crecimiento celular por una vía independiente de la activación de caspasas, a través de la activación de una vía de señalización alternativa (véase figura 11; Budd, 2002).

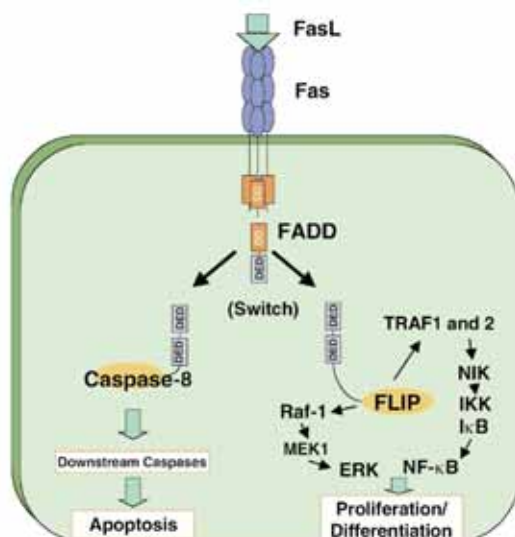


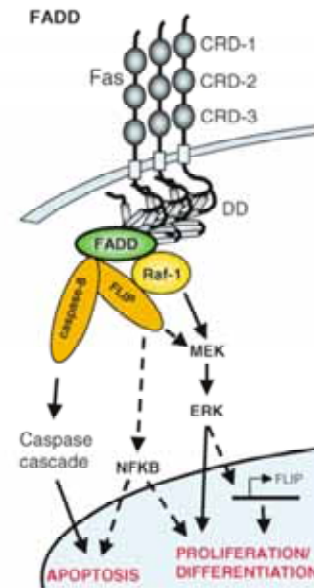
Figura 11. La proteína FLIP como molécula capaz de diferenciar entre señales de muerte celular o de proliferación mediadas por Fas. FLIP presenta homología con la caspasa-8, contiene 2 DED que pueden interactuar con el DED de FADD y presenta un dominio caspasa no funcional. FLIP se asocia físicamente con Raf-1 conectando la proteína FADD con la vía de las MAPK.

(Tomado de Budd, 2002)

La proteína FLIP (proteína inhibidora de la caspasa-8), a parte de bloquear la muerte inducida por Fas y la activación de caspasas, puede enviar señales hacia vías que conectan con la vía de las MAPK ERK, y desencadenar señales de proliferación/diferenciación (Budd, 2002; Lambert *et al.*, 2003). Además, se ha descrito que en varios tipos celulares, los receptores del factor de crecimiento se acoplan con la vía ERK normalmente a través de Ras, y que la función de la proteína FLIP podría ser reclutar la proteína Raf-1 directamente al complejo DISC y activar, sin necesidad de Ras, la vía de las MAPK (véase figura 12; Lambert *et al.*, 2003).

Figura 12. Vías de señalización iniciadas tras la interacción Fas/FADD.

(Tomado de Lambert *et al.*, 2003)



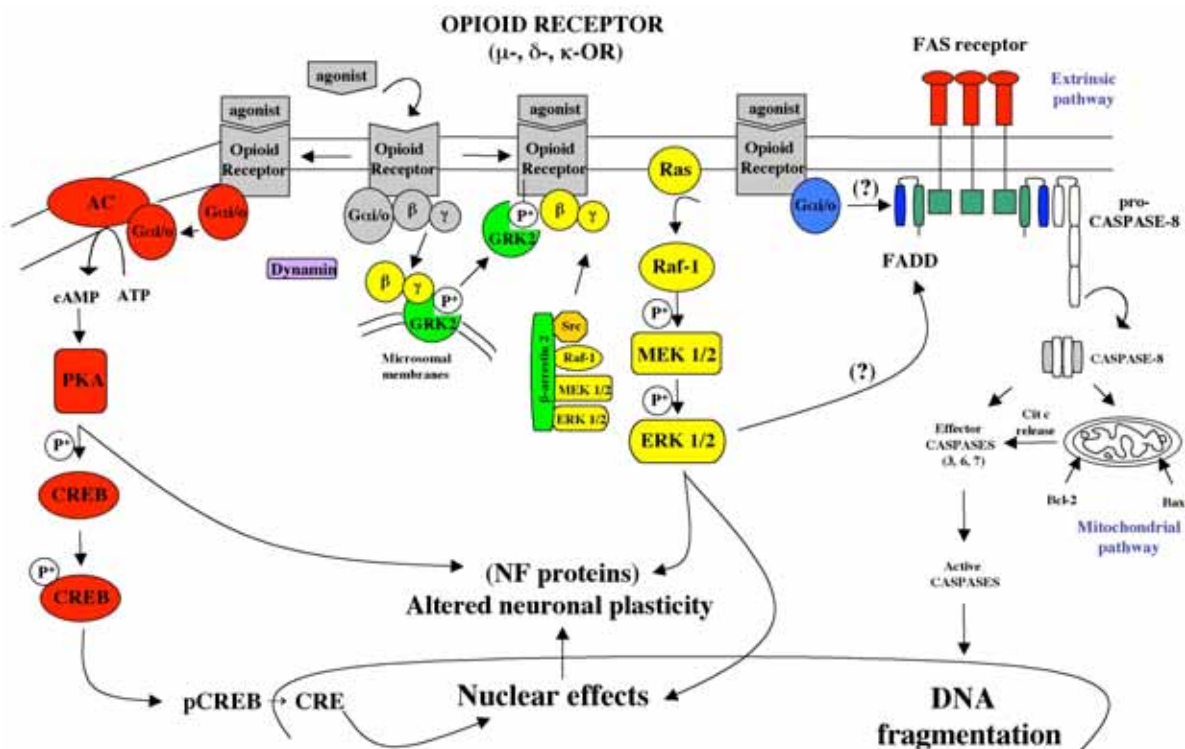
Como se puede comprobar y a diferencia de los efectos y mecanismos de apoptosis mediatizados por Fas, a los que se dedica mucha atención, los efectos neurobiológicos no apoptóticos del receptor Fas son poco conocidos. El receptor Fas puede, por tanto, inducir la activación de diferentes vías de señalización, apoptótica y no apoptótica, pudiendo ésta última inducirse en asociación con otros receptores, vía sus dominios transmembrana intracelulares (véanse figuras 11 y 12), o a través de proteínas citoplasmáticas, las cuales podrían afectar los resultados funcionales de Fas. Para finalizar, también habría que considerar el estado de activación de otras vías de señalización. Así, vías de supervivencia o de proliferación activadas por factores de crecimiento podrían prevenir la muerte celular programada iniciada por Fas (Pettmann y Henderson, 2003).

En el contexto de la adicción a opiáceos, se ha observado que estos fármacos promueven cierta variedad de efectos biológicos que parecen ser independientes de sus propiedades analgésicas y que también podrían afectar a la supervivencia celular o a la proliferación (véase Tegeder y Geisslinger, 2004). Así, la señalización de los receptores opioides se ha implicado en la regulación de la proliferación celular y muerte celular en varias células que

expresan receptores opioides. Se ha postulado que los efectos de promoción de crecimiento celular ocurren a bajas concentraciones o a dosis únicas del opiáceo y que son probablemente mediados a través de la activación de subunidades G $\beta\gamma$ de las proteínas G conectadas con la cascada Ras/ERK (Tegeder y Geisslinger, 2004). En este contexto, la administración de morfina se ha asociado con incrementos en la expresión y/o en la fosforilación de ERK en neuronas (Ortiz *et al.*, 1995; Berhow *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2001; resultados de este trabajo de Tesis), así como con la activación de ERK después del tratamiento con agonistas selectivos de los receptores δ - y κ -opiáceos (véase Tegeder y Geisslinger, 2004). Como la cascada de fosforilación de ERK es una de las principales vías de señalización involucradas en las respuestas mitogénicas por estímulos externos, se podría sugerir que ERK es un mensajero por el cual los opiáceos transmiten sus efectos neuroprotectores o de promoción de supervivencia. Se sabe que estos efectos se comparten por los receptores acoplados a proteínas G y son principalmente dependientes en la señalización de proteínas G (véase Tegeder y Geisslinger, 2004). Este trabajo de Tesis también pretendió explorar la participación de la vía MAPK ERK1/2 modulando los efectos de fármacos opiáceos sobre el sistema Fas/FADD.

II. OBJETIVOS

La adicción a opiáceos (heroína/morfina) y los mecanismos neurobiológicos que la subyacen, en gran parte todavía desconocidos, constituyen un tema de permanente actualidad. El desarrollo de este proceso crónico involucra cambios en los receptores μ -opioides y en sus sistemas de señalización, los cuales conducirían a alteraciones duraderas de ciertas formas de plasticidad neuronal (e.g., consecutivas a la modulación de la vía MAPK ERK) en regiones específicas del cerebro que se cree están en la base de los procesos de mantenimiento de la adicción. También en este sentido, la adicción a opiáceos, tanto en animales de experimentación como en el hombre, se ha asociado con alteraciones del citoesqueleto de las neuronas (e.g., contenido y grado de fosforilación de los neurofilamentos) que podrían reflejar procesos de neurotoxicidad y/o cambios plásticos neuronales relacionados con los procesos moleculares de la adicción. Por otra parte, estudios *in vitro* habían demostrado que ciertos fármacos opiáceos pueden activar mecanismos apoptóticos a través del receptor Fas en ciertas líneas celulares. Estos datos permitieron relacionar, como hipótesis de partida, que las alteraciones descritas para los neurofilamentos en adictos humanos a opiáceos pudieran ser la consecuencia de algún proceso inicial de daño neuronal, posiblemente mediado a través de mecanismos apoptóticos celulares (véase la Introducción de esta Tesis doctoral y el esquema que sigue).



Esquema de las vías de señalización de los receptores opioides y del receptor Fas.

OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Cuantificar los efectos agudos y crónicos de fármacos opiáceos (μ -, δ - y κ -selectivos) así como los cambios inducidos durante los estados de abstinencia (procesos de tolerancia y dependencia) sobre la vía de señalización del receptor Fas (formas de expresión de Fas, proteína de acople FADD y caspasas efectoras) en cerebro de rata.
2. Identificar el tipo de receptor opioide involucrado en la modulación del complejo de señalización Fas/FADD mediante la utilización de ratones deficientes en receptores opioides (μ -, δ - y κ -KO), e investigar la posible existencia de un tono opioide endógeno regulando las proteínas de esta vía en el cerebro.
3. Averiguar si la modulación del complejo Fas y/o FADD por fármacos opiáceos implica (como mecanismo molecular) la participación de MAPK ERK1/2, analizando la reversión de un efecto opioide tras inhibición selectiva de los enzimas MEK1/2, tanto *in vitro* (PD98059) en células SH-SY5Y, como *in vivo* (SL 327) en cerebro de rata.
4. Cuantificar en cerebro humano *postmortem* el estatus de la vía Fas/FADD y caspasas efectoras, así como los componentes de la vía de señalización del AMPc (AC/PKA/CREB) y de las MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK) en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos, como modelo experimental más directo al problema de la adicción en humanos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

En este apartado se incluyen los fármacos, anticuerpos, reactivos y los materiales utilizados en los distintos modelos experimentales descritos previamente, así como los distintos aparatos utilizados para el estudio.

FÁRMACOS

A continuación se detallan los fármacos utilizados y las entidades suministradoras (entre paréntesis):

- Morfina, clorhidrato (Unión Químico-Farmacéutica S.A.E, Madrid, España).
- Heroína, clorhidrato (Unión Químico-Farmacéutica S.A.E, Madrid, España).
- Sufentanilo, clorhidrato (Janssen Cylag S.A., Madrid, España).
- Naloxona, clorhidrato (Endo Laboratories, Garden City, NY, USA).
- SNC-80, base ((+)-4-[(α R)- α -(2R,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperaziny]-3-methoxybenzyl]-N-N,diethylbenzamide) (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK).
- Naltrindol, clorhidrato (17-(Cyclopropylmethyl)-6,7-dehydro-4,5 α -epoxy-3,14-dihydroxy-6,7-2',3'-indolomorphinan hydrochloride) (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK).
- U-50488-H, clorhidrato (1S-trans)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidiny) cyclohexyl]-benzeneacetamide) (Sigma/RBI, St Louis, Mo, USA).
- (-)-U-50488-H, clorhidrato (trans-(-)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidiny) cyclohexyl]-benzeneacetamide hydrochloride)) (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK).
- Nor-Binaltorpimina, dihidroclorato (17,17'-(Dicyclopropylmethyl)-6,6',7,7'-6,6'-imino-7,7'-binorphan-3,4',14,14'-tetrol dihydrochloride) (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK).
- (+)-SKF 10047, clorhidrato (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK).
- BD 1063, clorhidrato (1-[2-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]-4-methylpiperazine) (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK).
- (\pm) Pentazocina, clorhidrato (Laborios Fides, Barcelona, España).
- SL 327, base (α -[Amino[(4-aminophenyl)thio]methylene]-2-(trifluoromethyl) benzeneacetonitrile) (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK).
- PD 98059, base (2'-Amino-3'-metoxi-flavona) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA).

ANTICUERPOS

Anticuerpos primarios

A continuación se detallan los anticuerpos primarios (policlonales, tabla 1, y monoclonales, tabla 2) utilizados en este trabajo de Tesis doctoral.

Tabla 1. Anticuerpos primarios policlonales

ANTICUERPOS POLICLONALES	Especie inmunizada	Especie inmunogénica	Secuencia antigénica (inmunogen)	Proveedor y número catálogo	Lote
Fas (M-20)	Conejo	Ratón	péptido del extremo C-terminal	Santa Cruz sc-716	D 219 F 251 H 301 G 2004
Fas (C-20)	Conejo	Humano	péptido del extremo C-terminal (aa 300-319)	Santa Cruz sc-715	D 172 D 091
Fas (FL-335)	Conejo	Humano	aa 1-335 (secuencia completa)	Santa Cruz sc-7886	C 010
FADD (H-181)	Conejo	Humano	aa 28-209	Santa Cruz sc-5559	C 112
FADD (N-18)	Cabra	Humano	aa del DD N-terminal	Santa Cruz sc-1172	H 231
Caspasa-8 p20 (H-134)	Conejo	Humano	aa 217-350	Santa Cruz sc-7890	F 1604
Caspasa-3 (H-277)	Conejo	Humano	aa 1-277	Santa Cruz sc-7148	H 011
Bcl-2 (AC 21)	Conejo	Humano	aa 1-205	Santa Cruz sc-783	C 309 B 141
MEK 1/2	Conejo	Humano	péptido sintético (KLH-acoplado)	Cell Signaling 9122	4
pMEK1/2 (Ser217/221)	Conejo	Humano	fosfopéptido sintético alrededor residuos Ser217/221	Cell Signaling 9121	5
ERK 1/2	Conejo	Humano	péptido sintético	Calbiochem 442704	B42253
pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Conejo	Humano	fosfopéptido sintético alrededor residuos Thr202/Tyr204	Calbiochem 442685	B34314
Elk-1	Conejo	Humano	péptido sintético (KLH-acoplado)	Cell Signaling 9182	2-6
AC-I (V-20)	Conejo	Humano	péptido extremo C-terminal	Santa Cruz sc-586	-
PKA-C α (C-20)	Conejo	Humano	contra epítipo del extremo C-terminal	Santa Cruz sc-903	-
CREB	Conejo	Humano	péptido sintético, aa 5-24	Upstate Biotechnology 06-863	25369
pCREB (Ser133)	Conejo	Rata	fosfopéptido sintético aa 123-136	Upstate Biotechnology 06-519	31554

Tabla 2. Anticuerpos primarios monoclonales.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	Clon	Secuencia antigénica (inmunogen)	Proveedor y número catálogo	Lote
MONOCLONALES				
FADD	1	aa del dominio de muerte de origen humano	BD Transduction Lab 610399	6
β-actina	AC-15	péptido extremo N-terminal	Sigma A 1978	014K4840
Dinamina	41	aa del extremo C-terminal de la dinamina I de rata	BD Transduction Lab D25520	4
α-fodrina	-	fodrina cerebral bovina purificada	Chemicon, Inc MAB1685	21110247
NF-L	NR4	neurofilamentos purificados de la columna vertebral de cerdo	Amersham Sigma N 5139	109H4809
α-tubulina	B-5-1-2	filamentos resistentes a Sarkosyl	Sigma T 5168	051K4820
$G\alpha_{i2}$	L5	-	Leinco G111	-
Ras	18	secuencia completa de Ras de origen humano	Transduction Lab R02120	-
c-Raf-1	53	aa 162-378 de origen humano	Transduction Lab R19120	-

Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios utilizados en el estudio estaban constituidos por inmunoglobulinas de burro anti-inmunoglobulinas de conejo (NA 934, Amersham), por inmunoglobulinas de oveja anti-inmunoglobulinas de ratón (NA 931, Amersham), o por inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de cabra (A 5420, Sigma).

REACTIVOS Y MATERIALES

Otros reactivos empleados y su fuente de obtención correspondiente (entre paréntesis):

- **Reactivos:** ácido clorhídrico (HCl); acrilamida/bis-acrilamida (solución stock de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%) (Pronadisa, Hispanlab); albúmina bovina sérica (BSA, en polvo) (Sigma); azul de bromofenol (Sigma); cloruro potásico (KCl) (Sigma); cloruro sódico (NaCl) (Sigma); dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma); EDTA (Fluka Chemika); glicerol (Scharlau); glicina (Scharlau); KH_2PO_4 (Sigma); líquidos de revelado (revelador /fijador: reactivos de Kodak que procesan las películas fotográficas o autoradiogramas) (Sigma-Aldrich); $MgCl_2$ (Sigma); 2-mercaptoetanol (Sigma); metanol (Scharlau); Na_2HPO_4 (Sigma); persulfato amónico (APS) (Bio-Rad); Prestained SDS-PAGE Standards (Broad Range, Bio-Rad); pirofosfato sódico (Sigma-Aldrich); reactivos

- ECL y ECL-Plus (Amersham Biosciences); TEMED (Acros); Tris-base (tris-(hidroximetil)-aminometeno) (Scharlau).
- Enzimas: N-deglicosidasa-F (Sigma-Aldrich); fosfatasa alcalina de mucosa intestinal de ternera (Sigma-Aldrich).
 - Detergentes: Nonidet P-40 (NP-40) (Sigma); Tween-20 (Sigma); Sodio Dodecil Sulfato (SDS) (Panreac); Tritón X-100 (Sigma).
 - Inhibidores de proteasas: antipaina (Sigma); aprotinina (Sigma); E64 (Sigma); fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma); iodoacetamida (Sigma); leupeptina (Sigma); PEFABLOC (Boehringer Mannheim); pepstatina A (Sigma); inhibidor de la tripsina-quimotripsina (Sigma).
 - Determinación de proteínas: ampollas de albúmina bovina sérica (2 mg/ml en suero salino al 0.9% con 0.05% de azida sódica) (Pierce); $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck); Na_2CO_3 (Merck); reactivo BCA (reactivo A y reactivo B) (Pierce); reactivo Coomassie (Pierce); reactivo Folin-Ciocalteau (Sigma); tartrato sódico-potásico (Merck).
 - Línea celular SH-SY5Y: proporcionada gentilmente por el Dr. Beat M. Riederer (IBCM, Universidad de Lausanne, Suiza). El medio RPMI-1640 fue adquirido en Gibco BRL (Basel, Suiza).
 - Técnica “Western blotting” (fungible por orden de utilización): mini-geles de poliacrilamida (geles de 6 x 8 cm con un grosor de 1 mm, y geles de 7 x 10 cm con un grosor de 1.5 mm) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA); peines de Teflón TM de 1 mm y de 1.5 mm (Bio-Rad); cubeta de electroforesis (Bio-Rad); casete de transferencia (Bio-Rad); esponjas compresoras (Bio-Rad); membranas de nitrocelulosa para transferencia (tamaño de poro de 0.2 y 0.45 μm) (PROTRAN, Schleicher y Schuell); papel para cromatografía Whatman (Whatman 3MM Chr); películas fotográficas (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences); casete de exposición membrana-película fotográfica (X-omatic cassette) (Kodak, NY, USA).

APARATOS UTILIZADOS

Para llevar a cabo toda la metodología explicada se utilizaron los siguientes aparatos, mostrando la casa comercial que los proporciona (entre paréntesis):

- Tail-flick: Analgesy-Meter LE 7106 (LSI, Letice) (Panlab s.l., Barcelona, España).
- Homogenizador: Ultra-turrax (Ika-Werk, Janke y Kunkel); Polytron PCU (Kinematica AG, Luzern, Switzerland).
- Sonicador: Labsonic U (B. Braun, Biotech., Int.).
- Centrífuga: RC5C (Sorvall Instruments, USA).
- Espectrofotómetros: Pye Unicam o BioPhotometer, Eppendorf. Hamburg, Alemania.
- Fuente para la electroforesis y la transferencia: Power Pac 200 (Bio-Rad).
- Baño termoregulador: Unitronic-OR (P-Selecta).
- Analizadores de imagen: Bio-Image (84 μm) (Millipore, Ann Arbor, Michigan, USA); GS-700 (42 μm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
- Balanceador, agitador, vortex, mini-centrífuga.
- micropH 2000 (Crison Instruments, S.A., Alella, Barcelona).

MÉTODOS

En este apartado se detallan los modelos de experimentación, los tratamientos farmacológicos, así como la técnica inmunológica utilizada para desarrollar los objetivos propuestos en esta Tesis doctoral.

MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN (MUESTRAS BIOLÓGICAS)

Para abordar la realización de esta Tesis doctoral se utilizaron varios modelos de experimentación animal (muestras cerebrales de rata y muestras cerebrales de ratón), así como el modelo humano (muestras biológicas cerebrales humanas *postmortem*). También se realizaron una serie de experimentos *in vitro* en una línea celular de neuroblastoma humano (células SH-SY5Y).

Experimentos en cerebro de rata

Se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso comprendido entre 200-250 gramos y una edad aproximada de 8 a 9 semanas, criadas en el estabulario de la Facultad de Ciencias de la Universidad de las Islas Baleares. Esta especie animal se utilizó para realizar la mayoría de los tratamientos farmacológicos, para caracterizar las proteínas de estudio, y para realizar, en membranas corticales de cerebro de rata, varios ensayos *in vitro* (ver apartado de Preparación de las muestras).

Experimentos en cerebro de ratón

Ratones CD-1

Para caracterizar las distintas proteínas de estudio en cerebro también se usaron ratones albinos macho de la cepa CD-1, suministrados por Charles River (Barcelona), con un peso aproximado de 20-22 g. Al llegar al estabulario se dejaron una semana en cuarentena para ser utilizados posteriormente con un peso comprendido entre 25-30 g.

Los animales se estabularon en jaulas de polipropileno translúcidas con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, en condiciones ambientales controladas (la temperatura del estabulario se mantuvo entre 20-22°C y la humedad al 50-60%). Los animales recibieron, *ab libitum*, agua y una dieta estándar del tipo A04 (Rata Ratón Mantenimiento Panlab®) con la siguiente composición:

- Constituyentes analíticos:

Proteína bruta: 15.4%

Celulosa bruta: 4.1%

Materias grasas brutas:	2.9%
Cenizas brutas:	5.3%
Humedad:.....	11.3%

- Materias primas para la alimentación animal: cereales, productos y subproductos de semillas oleaginosas, minerales, semillas oleaginosas, aceites y grasas.
- Aditivos: Vitamina A (15000 UI/kg), Vitamina D3 (1500 UI/kg), Vitamina E (alfatocoferol) (20 mg/kg), y cobre (Sulfato cúprico pentahidratado) (12 mg/kg).
Prohibida la administración simultánea con vitamina D2.

Estos estudios en rata y ratón fueron aprobados por la comisión de investigación y ética de la Dirección General de Investigación (MCT, Madrid). Los experimentos se realizaron siguiendo las directrices descritas en “Principles of laboratory animal care” (NIH publication No. 85-23, versión de 1985), así como la normativa interna de la Universidad de las Islas Baleares al respecto.

Modelo KO (ratones deficientes en receptores opioides)

Los ratones deficientes en un tipo de receptor opioide fueron generados en el laboratorio de la Dra. B.L. Kieffer (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, France) y tratados en el del Dr. R. Maldonado (Laboratori de Neurofarmacologia, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona) (ver apartado de Tratamientos farmacológicos). Se utilizaron ratones homocigotos deficientes en uno de los receptores opioides (receptor μ - o MOP, δ - o DOP, κ - o KOP-KO), y los respectivos ratones control (WT: *wild type*) (véase García-Sevilla *et al.*, 2004), para estudiar el tipo de receptor que podría estar implicado en modular la actividad basal del sistema en estudio (receptor Fas/FADD).

Los ratones deficientes en el receptor μ -opioide (μ -KO) se generaron por disrupción del segundo exón del gen del receptor (Matthes *et al.*, 1996). Los ratones deficientes en los receptores δ - (Filliol *et al.*, 2000) y κ -opioides (Simonin *et al.*, 1998) (δ - y κ -KO) se crearon por supresión del primer exón codificante en el gen del receptor correspondiente. Los animales homocigotos para cada mutación fueron fértiles, se generaron siguiendo la frecuencia mendeliana esperada, tuvieron un crecimiento normal y no mostraron alteraciones aparentes en el desarrollo, ni cambios compensatorios en el sistema opioide. En otros estudios, se había comprobado que en experimentos de unión con radioligandos, la eliminación de un receptor opioide específico no produjo cambios mayores en la

expresión de los lugares de unión de los otros receptores opioides (Matthes *et al.*, 1996; Kitchen *et al.*, 1997; Simonin *et al.*, 1998; Filliol *et al.*, 2000; Kieffer y Gavériaux-Ruff, 2002). Todos los ratones utilizados tenían un fondo genético híbrido entre las cepas 129 SV y C57BL/6 (50% y 50%). Al iniciar los experimentos los ratones tenían una edad comprendida entre 16 y 20 semanas. Se estabularon 5 por caja en una habitación con la temperatura controlada ($21\pm 1^\circ\text{C}$) y un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Se manipuló a los animales durante la semana previa al tratamiento para que se acostumbraran a su manejo.

Experimentos en cerebro humano

Las muestras cerebrales humanas procedieron de cerebros *postmortem* pertenecientes a sujetos control (con perfil toxicológico negativo), que murieron por causas accidentales violentas, o de cerebros de sujetos adictos a opiáceos, fallecidos por una sobredosis de opiáceo según determinación forense. Estas muestras (biopsias del área 9/10 de Brodmann de la corteza prefrontal) se obtuvieron en el transcurso de autopsias judiciales realizadas en el Instituto de Medicina Legal del cantón de Ginebra (Suiza) (véase Ferrer-Alcón *et al.*, 2004) durante el período comprendido entre 1998 y 2004. Durante las autopsias, se obtuvieron muestras (sanguíneas y capilares) de los sujetos fallecidos para realizar determinaciones toxicológicas con el fin de detectar la presencia de opiáceos, de alcohol o de otros tipos de sustancias psicoactivas. Para la recogida y caracterización de estas muestras de cerebro se siguieron las directrices de un protocolo conjunto entre el Departamento de Psiquiatría y el Departamento de Medicina Legal que fue aprobado por el comité ético de la Facultad de Medicina de la Universidad de Ginebra. Estas muestras biológicas se utilizaron para caracterizar las proteínas de estudio en cerebro humano (homogenados de sujetos control) y para observar los efectos que la adicción a opiáceos en humanos causa sobre las proteínas de estudio (ver apartado de Tratamientos farmacológicos para la selección de sujetos control y adictos a opiáceos).

Experimentos en células SH-SY5Y

Para la caracterización de diversas proteínas del estudio en neuronas, se utilizaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (un clon celular de SK-N-SH que expresa una gran densidad de receptores μ - y δ -opioides, en proporción 4:1) (Yu *et al.*, 1986). Las células se hicieron crecer en monocapa (en un incubador a 37°C y 5% CO_2 /95% aire humidificado) en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal de ternera (10%), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 $\mu\text{g/ml}$), y tras

confluencia, se prepararon las membranas para su uso siguiendo métodos rutinarios. La preparación de estas células y sus correspondientes experimentos se realizaron durante una estancia de la doctoranda en el Departamento de Psiquiatría de la Universidad de Ginebra.

TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Experimentos en cerebro de rata

Tratamientos agudos

Se realizaron los siguientes tratamientos agudos con fármacos opiáceos y no opiáceos (caso del agonista $\sigma 1$) en ratas, cuya dosis, vía de administración y tiempo de acción (entre paréntesis) se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos agudos en ratas.

Fármacos	TRATAMIENTOS AGUDOS	Dosis	Vía de administración	Tiempo hasta sacrificio
AGONISTAS				
μ-opioide	Heroína	10 mg/kg	i.p.	2 h
	Morfina (dosis-respuesta)	3, 10, 30 y 100 mg/kg	i.p.	2 h
	Sufentanilo (dosis-respuesta)	1, 2.5, 5, 15 y 30 μ g/kg	s.c.	30 min
	(curso temporal)	15 μ g/kg	s.c.	30-120 min
δ-opioide	SNC-80 (dosis-respuesta)	1, 3, 10 mg/kg	i.p.	30 min
	(curso temporal)	10 mg/kg	i.p.	30-120 min
κ-opioide	U-50488-H (dosis-respuesta)	1, 3, 10 mg/kg	i.p.	60 min
	(curso temporal)	10 mg/kg	i.p.	30-120 min
$\sigma 1$-selectivo	(+)-SKF 10047	5 mg/kg	i.p.	2 h
ANTAGONISTAS				
inespecífico-$\mu/\delta/\kappa$	Naloxona	10 mg/kg	i.p.	90 min
	(dosis-respuesta)	1, 10 y 100 mg/kg	i.p.	2 h
	Naloxona (60 min) + Sufentanilo	10 mg/kg 15 μ g/kg	i.p. i.p.	30 min
específico-δ	Naltrindol	5 mg/kg	i.p.	90 min
	Naltrindol (60 min) + SNC-80	5 mg/kg 10 mg/kg	i.p. i.p.	30 min
	Nor-Binaltorpimina	5 mg/kg	i.p.	90 min
específico-κ	Nor-Binaltorpimina (30 min) + U-50488-H	5 mg/kg 10 mg/kg	i.p. i.p.	60 min
	BD-1063	10 mg/kg	i.p.	150 min
específico-$\sigma 1$	BD-1063 (30 min)	10 mg/kg	i.p.	
	(+)-SKF 10047	5 mg/kg	i.p.	120 min

En todas las series experimentales las ratas control recibieron el vehículo requerido para disolver el fármaco (1 ml/kg de suero salino, NaCl al 0.9%, o 1 ml/kg de dimetil sulfóxido, DMSO, sólo para el caso del agonista δ -selectivo SNC-80) por la vía de administración indicada. En los tratamientos en los que se realizó el antagonismo se administró el fármaco antagonista y después, al tiempo indicado, el fármaco agonista. Los animales se sacrificaron por decapitación al tiempo indicado para cada tratamiento. El cerebro se extrajo rápidamente, diseccionándose en hielo las regiones cerebrales de interés, en nuestro caso particular, las dos medias cortezas parieto-occipitales, la corteza frontal y el cuerpo estriado que se guardaron en viales y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y almacenaron, para su posterior utilización, en un congelador a -80°C .

Tratamientos crónicos

Se realizaron los siguientes tratamientos crónicos con fármacos opiáceos y no opiáceos (caso del agonista $\sigma 1$) en ratas, cuya dosis, vía de administración, duración del tratamiento y tiempo desde la última dosis hasta el sacrificio del animal se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos crónicos en ratas.

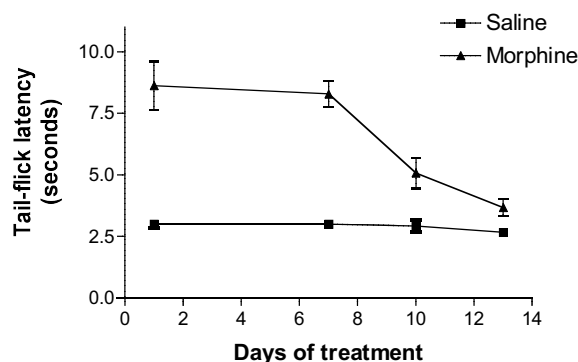
Fármacos	TRATAMIENTOS CRÓNICOS (con o sin precipitación de abstinencia)	Dosis	Vía de administración	Tiempo hasta sacrificio
μ -agonistas	Heroína (5 días)	5-30 mg/kg	i.p.	2 h
	+ Naloxona	2 mg/kg	i.p.	2 h
	+ abstinencia espontánea	-	-	48 h
	Morfina (5 días)	10-100 mg/kg	i.p.	2 h
	+ Naloxona	2 mg/kg	i.p.	2 h
	+ abstinencia espontánea	-	-	48 h
antagonista opioide	Morfina (13 días)	10 mg/kg	i.p.	24 h
	Naloxona (13 días)	10 mg/kg	i.p.	24 h
	Naloxona (30 min, 13 días) + Morfina (13 días)	10 mg/kg 10 mg/kg	i.p. i.p.	24 h
δ -agonista	SNC-80 (5 días)	10 mg/kg	i.p.	30 min
	+ Naltrindol	5 mg/kg	i.p.	2 h
κ -agonista	U-50488-H (5 días)	10 mg/kg	i.p.	1 h
	+ Nor-Binaltorpimina	5 mg/kg	i.p.	2 h
$\sigma 1$ -agonista/ μ -antagonista	Pentazocina (5 días)	10-80 mg/kg	i.p.	2 h
$\sigma 1$ -agonista	(+)-SKF 10047 (3 días)	3-10 mg/kg	i.p.	2 h

Los animales tratados de forma crónica (5 días) con heroína (5-30 mg/kg) recibieron la siguiente relación de dosis: día 1: 5, 10 y 10 mg/kg; día 2: 10, 15, y 15 mg/kg; día 3: 15, 20, y 20 mg/kg; día 4: 20, 25, y 25 mg/kg; día 5: 25 y 30 mg/kg (Ventayol *et al.*, 1997).

En ratas tratadas crónicamente con heroína se indujo el síndrome de abstinencia, por la administración de naloxona (2 mg/kg, i.p., 2 h), o espontáneamente (48 h).

Para el tratamiento crónico con morfina, se inyectaron las ratas tres veces al día intraperitonealmente (i.p.) (a las 8:30, 14:30 y a las 20:30 h) durante 5 días consecutivos con el consiguiente aumento en la dosis de opiáceo: día 1: 10, 10, y 10 mg/kg; día 2: 10, 20, y 20 mg/kg; día 3: 20, 20, y 40 mg/kg; día 4: 40, 40, y 80 mg/kg; día 5: 80 y 100 mg/kg. En otra serie de experimentos las ratas recibieron dos veces al día (cada doce horas) morfina (10 mg/kg, i.p.) durante 13 días. Las ratas tratadas crónicamente con morfina durante 5 días presentaron un elevado grado de tolerancia y dependencia (Ulibarri *et al.*, 1987; Escribá *et al.*, 1994), mientras que las tratadas durante 13 días mostraron un marcado grado de tolerancia (Boronat *et al.*, 1998). Se realizó el test de la actividad analgésica (“Tail-Flick Test”) para comprobar el grado de tolerancia conseguido con la administración crónica de morfina (13 días) (véase figura 1).

Figura 1. El test de analgesia consiste en aplicar un foco calorífico a unos 4-6 cm del extremo caudal de la cola de la rata, manteniendo la temperatura ambiente de la habitación a unos $24\pm 1^\circ\text{C}$, y ajustando como latencias basales tiempos de 3-4 s. El tiempo de latencia (TL) es por tanto, el tiempo que el animal tarda en realizar un movimiento característico con la cola para apartarla del foco calorífico. La latencia basal (media de tres medidas realizadas) se determinó para cada animal antes de administrar la morfina.



Se estableció un tiempo límite de exposición al foco de calor denominado TL límite o “cut-off”, que equivalía a tres veces el TL basal para cada animal (entre 9-12 s). En el tratamiento crónico (13 días) con morfina se realizaron mediciones de analgesia el día 1, 7, 10, y 13 para así comprobar el desarrollo del fenómeno de tolerancia en ratas tras una exposición prolongada al opiáceo. Los días señalados se midió el TL basal (antes de administrar el fármaco) y el TL después de su administración, y se compararon los distintos tiempos obtenidos a medida que avanzó el tratamiento.

La analgesia inducida tras la administración aguda de morfina se tradujo en un aumento del tiempo de latencia, que fue revirtiendo a valores control a medida que el animal desarrolló tolerancia al fármaco opiáceo (véase figura 1). Estos resultados pusieron de manifiesto la eficacia de los tratamientos crónicos realizados con morfina.

Para el tratamiento crónico con naloxona (10 mg/kg, i.p.) los animales recibieron el antagonista opiáceo cada 12 h durante 13 días. En un experimento paralelo, un grupo de ratas recibió cada 12 h durante 13 días una inyección de naloxona (10 mg/kg, i.p.) seguida, 30 minutos después, por una inyección de morfina (10 mg/kg, i.p.).

Para realizar el tratamiento crónico con el agonista δ -selectivo, SNC-80, se administró diariamente una única dosis de fármaco (10 mg/kg, i.p.) durante 5 días. Las ratas tratadas crónicamente con el opiáceo SNC-80 presentaron tolerancia a la respuesta antinociceptiva del fármaco (Khotib *et al.*, 2004). A ratas previamente tratadas con SNC-80 durante 5 días se les administró el antagonista selectivo δ -opioide (naltrindol, 5 mg/kg, i.p., 2 h), para intentar desarrollar un síndrome de abstinencia, encontrándose poca dependencia al fármaco (Brandt *et al.*, 2001) en cuanto a la aparición de signos conductuales que fueron muy moderados.

El tratamiento crónico con el agonista κ -selectivo, U-50488-H, se realizó administrando diariamente una única dosis de fármaco (10 mg/kg, i.p.) durante 5 días (Khotib *et al.*, 2004). En ratas tratadas crónicamente con U-50488-H se intentó precipitar un síndrome de abstinencia por la administración de nor-binaltorpimina (5 mg/kg, i.p., 2 h). La abstinencia después de la administración crónica de este fármaco no produjo signos conductuales llamativos de acuerdo con la ausencia de signos de abstinencia en neuronas del ventrículo de rata (Milanés y Laorden, 1998).

En otro grupo experimental, los animales recibieron pentazocina (10-80 mg/kg, i.p.) tres veces al día durante 5 días (Ventayol *et al.*, 1997).

Otras ratas se trataron crónicamente con (+)-SKF 10047 (3-10 mg/kg, i.p.) durante tres días. Recibieron dos inyecciones diarias (8:30 y 20:30) con el consiguiente aumento en la dosis de fármaco: día 1: 3 y 3 mg/kg; día 2: 5 y 5 mg/kg; día 3: 10 y 10 mg/kg.

En todas las series experimentales, las ratas control recibieron el vehículo, 1 ml/kg de solución salina (NaCl 0.9%, i.p.) o 1ml/kg de DMSO (para el tratamiento crónico con SNC-80) a los tiempos indicados para cada tratamiento. Previamente a la realización del tratamiento crónico con SNC-80 se realizaron pruebas de toxicidad del DMSO (1 ml/kg, 5 días) que resultó inocuo. Los animales fueron sacrificados por decapitación al tiempo indicado para cada tratamiento (véase tabla 2). Los cerebros se extrajeron y se diseccionó sobre hielo la corteza parieto-occipital, la corteza frontal y el cuerpo estriado, que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Otros tratamientos en ratas

En otra serie experimental, se estudió el efecto del SL 327 (un derivado bencenoacetnitrilo y un inhibidor específico de la MEK1/2 que bloquea la activación de ERK1/2 *in vivo*) (Scherle *et al.*, 2000) sobre la regulación de la proteína FADD por el

agonista opioide δ -selectivo (SNC-80). Se trataron animales de forma aguda con el inhibidor selectivo de la MEK1/2 (SL 327, 20 mg/kg, i.p., 90 min) solo, o 60 minutos antes de administrar SNC-80 (10 mg/kg, i.p., 30 min) para bloquear la activación de ERK1/2. Las ratas control recibieron DMSO (1 ml/kg, i.p.) o SNC-80 (10 mg/kg, i.p., 30 min). Los animales se sacrificaron a los tiempos indicados, se diseccionaron las 2 medias cortezas parieto-occipitales, la corteza frontal y el cuerpo estriado, que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Experimentos en cerebro de ratón (MODELO KO)

Los ratones deficientes en los receptores opioides fueron tratados en el laboratorio del Dr. R. Maldonado (Laboratori de Neurofarmacologia, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona). Los ratones deficientes en los receptores opioides (ratones μ -, δ -, κ -KO) y sus respectivos controles nativos (WT) fueron inyectados i.p. con solución salina (0.9%) en un volumen de 0.1 ml por 10 g de peso corporal, y fueron sacrificados por decapitación a las 2 horas. Los cerebros se extrajeron, se diseccionaron las regiones de interés (corteza parieto-occipital y estriado), se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, y almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización. Para estos experimentos se utilizaron un total de 30 ratones, divididos en tres grupos con la siguiente composición: grupo I (5 WT tratados con salino, 5 μ -KO tratados con salino), grupo II (5 WT tratados con salino, 5 δ -KO tratados con salino) y grupo III (5 WT tratados con salino, 5 κ -KO tratados con salino). Cada bloque experimental se estudió 2-3 veces lo que permitió la cuantificación de 10-15 muestras para cada subgrupo de ratones.

Modelo humano (experimentos en cerebro humano *postmortem*)

En este apartado se detalla la selección realizada de los sujetos control y de los sujetos adictos utilizados para este estudio detallando las características demográficas y los datos toxicológicos individuales de cada sujeto. Como ya se mencionó previamente, para la realización de este trabajo de Tesis doctoral se utilizaron biopsias del área 9/10 de Brodmann de la corteza prefrontal de sujetos adictos a opiáceos (estado tolerante), que fallecieron, la mayoría, por una sobredosis de heroína y/o metadona, y de sujetos control, que fallecieron por causas accidentales, autopsiados en el Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Ginebra.

En total se utilizaron muestras procedentes de 111 sujetos, distribuidas en tres series diferentes. La primera serie correspondió a un grupo de 48 sujetos: 24 adictos (fallecidos por una sobredosis de opiáceo) emparejados con 24 sujetos control (véase tabla 5). Esta serie se utilizó para inmunodetectar y cuantificar los cambios en las inmunodensidades de las proteínas de la vía del AMPc y de las MAPK (véase Resultados, Artículo V). En la segunda y tercera serie (compuesta por 63 sujetos) se diferenciaron dos grupos de sujetos adictos a opiáceos diferentes en cuanto a la duración de la adicción: una serie de 21 sujetos fallecidos la mayoría por una sobredosis de opiáceo (excepto los sujetos 26 y 41, véase tabla 6), con características similares a los sujetos de la primera serie, a los que se denominó “long-term abuse” (detección de opiáceos en muestras de pelo), y otra serie, agrupada como sujetos adictos “short-term abuse”, formada por 15 sujetos que al fallecer presentaron concentraciones letales de opiáceo en sangre, pero que en el análisis toxicológico en muestras de pelo no mostraron signos de cronicidad en la utilización de la droga, bien por tratarse de individuos no adictos (sin historial clínico) o de ex-adictos que habían perdido su tolerancia al opiáceo (véase toxicología en pelo, tabla 7). Esta segunda y tercera serie se emparejó con un grupo de 27 sujetos control y se utilizó para inmunodetectar y cuantificar modulaciones en las proteínas de la cascada apoptótica iniciada a través del complejo Fas/FADD (véase Resultados, Anexo experimental III).

Todos los sujetos fueron bien caracterizados en cuanto a historial clínico de abuso de opiáceos, toxicología cuantitativa en sangre y en pelo, y otros detalles, como el emparejamiento control-adicto con respecto a la edad, sexo y retraso autopsico (véanse tablas 5, 6 y 7 detalladas a continuación).

Tabla 5. Características demográficas y datos toxicológicos individuales de “adictos crónicos” a opiáceos y sus controles (serie 1).

	Sexo/Edad* (años)	PMD (h)	Opiáceos en sangre (µg/ml)	Otros fármacos (µg/ml) Etanol (g/l)	Opiáceos y otras drogas en pelo (ng/mg)
1	M/18 (M/20)	21 (35)	Met (1.1)	Cloroquina (1.5) + Metaqualona (0.2)	Met (0.4) + MAM (4.8)
2	M/19 (M/20)	26 (35)	Mor (0.2)	Ninguno	NT
3	M/23 (M/15)	66 (70)	Mor (1.7)	Ninguno	NT
4	M/23 (M/15)	55 (70)	Met (1.5)	Tioridacina (1.4)	Mor (0.4) + MAM (2.2)
5	M/39 (M/40)	56 (48)	Mor (1.1)	Etanol (2.4)	MAM (2.5)
6	M/30 (M/37)	60 (48)	Mor (1.5)	Ninguno	MAM (1.2)
7	M/25 (M/23)	41 (38)	Met (0.7)	Ninguno	NT
8	M/25 (M/20)	26 (35)	Mor (1.1)	Etanol (0.4)	MAM (0.9)
9	M/26 (M/28)	44 (36)	Mor (0.3) + Codeína (3.6)	Etanol (0.05)	Mor (0.3) + MAM (1.3)
10	M/25 (M/28)	50 (36)	Met (0.5)	Cocaína (0.05)	Mor (0.4) + MAM (1.1)
11	M/26 (M/34)	73 (67)	Mor (1.7)	Cocaína (0.04)	Mor (1.3) + MAM (13.0)
12	M/23 (M/31)	52 (62)	Met (1.3)	Etanol (0.06)	Met (0.5) + MAM (0.2)
13	M/29 (M/22)	25 (16)	Met (0.5)	Citalopram (3.4)	Met (1.1)
14	M/26 (M/27)	20 (22)	Met (0.3)	Etanol (0.12)	Met (0.6)
15	M/26 (M/27)	13 (22)	Mor (2.0)	Etanol (0.28)	Met (4.0) + MAM (0.4)
16	M/40 (M/48)	16 (24)	Met (0.8)	Quinina (1.2)	Met (0.8)
17	M/33 (M/40)	16 (24)	Mor (1.5)	Etanol (0.87)	Met (14.2) + MAM (0.4)
18	M/44 (M/44)	19 (19)	Mor (0.6)	Ninguno	Mor (0.2)
19	M/32 (M/36)	29 (29)	Mor (1.6) + Codeína (0.5)	Etanol (0.15)	Mor (0.7) + Cocaína (1.0)
20	M/42 (M/44)	28 (19)	Met (0.4)	Ninguno	Met (13.5)
21	M/42 (F/50)	18 (10)	Mor (0.8)	Etanol (1.64)	Mor (0.4)
22	M/46 (F/50)	13 (10)	Mor (0.8)	Cocaína (0.2)	Mor (0.2) + Cocaína (6.5)
23	F/28 (M/23)	13 (17)	Met (1.4)	Cocaína (0.02)	Met (4.7) + Cocaína (0.9)
24	M/29 (M/35)	38 (29)	Met (0.4)	Etanol (0.36)	Met (1.3) + Mor (0.8)
<hr/>					
Grupo adictos					
23M/1F		34±4 h	Mor (1.2±0.2, n=13)		
30±2 años			Met (0.8±0.1, n=11)		
<hr/>					
Grupo control					
18M		34±4 h			
33±2 años					

*Entre paréntesis se presentan los valores de los respectivos sujetos control con los que se han emparejado los adictos. PMD (h), retraso autopsico (período de tiempo entre la muerte y el almacenamiento de la muestra cerebral). NT: no testado. La causa de la muerte de todos los adictos a opiáceos fue una sobredosis de heroína [detección de 6-monoacetilmorfina (MAM) y morfina libre (Mor) en sangre] o metadona (Met, detección de Met y su metabolito 2-etilidina-1,5-dimetil-3,3-difenilpirroindona en sangre). Las determinaciones cuantitativas de opiáceos así como la de otros fármacos en muestras de sangre y de pelo se realizaron como se describe en este apartado. Algunos sujetos también dieron positivo para benzodiazepinas y cannabinoides en muestras de orina.

En la tabla 6 y 7 se muestran los sujetos adictos “long-term abuse” (serie 2) fallecidos la mayoría por una sobredosis de opiáceo (tabla 6) y los sujetos adictos “short-term

abuse” (serie 3) fallecidos por una dosis letal de opiáceo pero que no mostraron indicios de cronicidad a la droga (véase toxicología en pelo, tabla 7).

Tabla 6. Características demográficas y datos toxicológicos individuales de los adictos a opiáceos “long-term abuse” (A(L)) y sus controles (serie2).

Sexo/Edad* (años)	PMD (h)	Opiáceos en sangre (µg/ml)	Otros fármacos (µg/ml) Etanol (g/l)	Opiáceos y otras drogas en pelo (ng/mg)
25 F/45 (F/49)	60 (77)	Met (3.7) + Codeína (4.3)	Etanol (0.35)	Met (3.3) + Codeína (14)
26** M/31 (M/36)	48 (44)	Mor (0.07)	Ninguno	MAM (0.2) + Cocaína (14)
27 F/37 (M/39)	34 (25)	Met (0.25)	Etanol (3.7)	MAM (1.6) + Cocaína (8)
28 F/24 (M/38)	75 (77)	Met (0.5)	Ninguno	Met (0.2) + MAM (0.4)
29 M/36 (M/27)	3 (10)	Mor (0.74)	Clomipramina (0.4)	Mor (0.6) + MAM (1.9) + Met (0.5)
30 M/34 (M/38)	86 (77)	Mor (0.85)	Etanol (1.72)	Met (0.7) + MAM (0.5) + Cocaína (0.8)
31 M/42 (M/40)	5 (12)	Met (4.3)	Ninguno	Met (65) + Cocaína (0.9)
32 M/50 (M/52)	28 (28)	Mor (0.13) + Met (0.4)	Ninguno	Mor (4.5) + MAM (20) + Met (0.6)
33 F/46 (M/52)	32 (28)	Mor (0.9)	Ninguno	Mor (0.4) + MAM (0.2) + Met (0.8) + Codeína (13)
34 M/24 (F/23)	53 (55)	Mor (1.2)	THC (0.007)	Mor (0.3) + MAM (1.5) + Cocaína(4.5)
35 M/34 (M/30)	3 (10)	Met (0.3)	Ninguno	Met (0.4) + Mor (1.8) + MAM (0.8)
36 F/33 (F/30)	16 (15)	Met (1.4)	Venlafaxina (2.5)	Met (0.4)
37 F/20 (M/34)	51 (42)	Mor (0.4)	Etanol (1.2) + Venlafaxina (0.3)	Mor (0.1) + MAM (0.4) + Cocaína (0.9)
38 M/25 (M/20)	7 (21)	Mor (0.3)	Etanol (1.77)	Mor (0.2) + MAM (1.7) + Met (135) + MDMA (6.2)
39 M/47 (M51)	96 (93)	Met (3.3)	Metaqualona (10.5)	Met (8.7) + Cocaína (0.9)
40 F/35 (F/26)	12 (10)	Met (1.7)	Fluoxetina (0.5)	Met (20) + Mor (0.8) + MAM (0.5)
41** F/36 (M/39)	8 (8)	Mor (0.11)	Cocaína (0.18)	Mor (0.5) + MAM (0.6) + Codeína (2.7) + Cocaína (13)
42 F/30 (F/39)	40 (34)	Met (0.25) + Mor (0.15)	Ninguno	Met (1.9) + Mor (1.4) + MAM (2.5) + Cocaína (40)
43 F/26 (F/39)	33 (34)	Met (1.4)	Cocaína (<0.1)	NT
44 F/35 (M/41)	25 (27)	Met (0.3)	Mirtazapina (0.35)	Met (11) + Mor (0.7) + MAM (0.8) + Cocaína (29)
45 F/48 (M/46)	29 (29)	Mor (0.55) + Met (0.6)	Citalopram (1.5) + Olanzapine (0.3)	MAM (1.4) + Cocaína (21)
<hr/>				
Grupo A(L)				
9M/12F	35±6 h	Mor (0.5±0.1, n=10)		
35±2 años		Met (1.6±0.5, n=11)		
<hr/>				
Grupo control				
18M/9F	34±5 h			
38±2 años				

*Entre paréntesis se presentan los valores de los respectivos sujetos control con los que se han emparejado los adictos. ** Fallecimiento por otras causas (no debido a sobredosis de opiáceo), sujetos 26 y 41. Todos los sujetos de la tabla 6 presentaron historia clínica de adicción crónica a opiáceos. Para otros detalles véase pie de tabla 5.

Tabla 7. Características demográficas y datos toxicológicos individuales de los adictos a opiáceos “short-term abuse” (A(S)) y sus controles (serie 3).

	Sexo/Edad* (años)	PMD (h)	Opiáceos en sangre (µg/ml)	Otros fármacos (µg/ml) Etanol (g/l)	Opiáceos y otras drogas en pelo (ng/mg)
46	M/45 (M/38)	57 (59)	Met (0.35)	Etanol (0.45) + Citalopram (0.2)	Ninguno
47	F/41 (F/49)	60 (77)	Mor (0.94)	Venlafaxina (0.5)	Ninguno
48	M/33 (M/36)	38 (44)	Met (0.2)	Etanol (1.36)	Ninguno
49	M/44 (M/39)	29 (25)	Mor (0.3)	Etanol (1.17)	Cocaína (1)
50	M/29 (M/38)	63 (77)	Mor (0.3)	Ninguno	Ninguno
51	M/28 (M/27)	2 (10)	Mor (0.9)	Ninguno	Ninguno
52	F/35 (M/38)	62 (77)	Mor (0.25)	Ninguno	Ninguno
53	M/40 (M/40)	12 (12)	Met (0.3)	Etanol (0.62)	Ninguno
54	M/51 (M/56)	16 (16)	Mor (0.35)	Etanol (1.99)	Cocaína (2)
55	F/32 (F/23)	43 (55)	Mor (1.45)	Ninguno	Ninguno
56	M/33 (M/29)	22 (25)	Mor (0.9)	Ninguno	Ninguno
57	M/32 (M/27)	22 (20)	Mor (0.6) + Codeína (0.3)	Ninguno	Ninguno
58	M/30 (M/34)	37 (42)	Mor (0.2)	Etanol (1.45)	Ninguno
59	M/18 (M/20)	20 (21)	Met (0.3)	Citalopram (0.1) + THC (0.002)	Ninguno
60	F/33 (F/26)	14 (10)	Met (2.2)	Olanzapina (1.1)	Ninguno
<hr/>					
Grupo A(S)					
	11M/4F	33±5 h	Mor (0.6±0.1, n=10)		
	35±2 años		Met (0.7±0.4, n=5)		
<hr/>					
Grupo control					
	18M/9F	34±5 h			
	38±2 años				

*Entre paréntesis se presentan los valores de los respectivos sujetos control con los que se han emparejado los adictos. Los sujetos control de las tablas 6 y 7 son comunes ya que el diseño experimental consistió en cuantificar simultáneamente un control, un A(L) y un A(S). Para otros detalles véase pie de tabla 5.

La corteza prefrontal se escogió como diana de estudio ya que incluye áreas importantes relacionadas funcionalmente con el sistema de recompensa mesolímbico dopaminérgico que es de relevancia en la adicción a opiáceos (Simonato, 1996; Williams *et al.*, 2001). Además, la primera serie de sujetos adictos, utilizada en estudios paralelos, puso de manifiesto niveles anómalos de expresión de los receptores μ -opioides y de los mecanismos que regulan el receptor en la corteza prefrontal (Ferrer-Alcón *et al.*, 2004). Al realizar el análisis toxicológico en muestras sanguíneas de los sujetos adictos, se encontraron concentraciones letales de morfina o metadona en todos aquellos sujetos en los que la sobredosis de heroína o metadona fue la causa de la muerte (véanse tablas 5, 6 y 7). En estos sujetos, mediante la detección en muestras de pelo (3-10 cm desde la raíz) de 6-monoacetilmorfina (rango 0.2-13 ng/mg), morfina (rango 0.1-1.4 ng/mg) o metadona

(rango 0.2-40 ng/mg), se pudo estimar la cronicidad de estas adicciones a opiáceos, que como mínimo osciló entre 6-12 meses antes de la muerte (tablas 5, 6, véase también Tagliaro *et al.*, 1998). Alguno de estos sujetos adictos a opiáceos presentó niveles de etanol en sangre (serie 1: rango 0.05-2.4 g/l, n=10; series 2 y 3: rango 0.35-1.99 g/l, n=10), aunque sin evidencias médicas de un diagnóstico de dependencia a etanol. En muestras sanguíneas de alguno de estos sujetos adictos a opiáceos también se encontraron otros fármacos (e.g., concentraciones bajas de cocaína; tablas 5 y 6) aunque este psicoestimulante no alteró, al parecer, el contenido de las proteínas diana (véase Resultados, Artículo V).

Los cerebros control (corteza prefrontal derecha) se obtuvieron en el momento de la autopsia de sujetos potencialmente sanos que murieron en el mismo período y que siguieron criterios específicos de emparejamiento (sexo, edad, retraso autopsico) con los adictos a opiáceos (incluido análisis toxicológico negativo). En algunos sujetos control también se detectó etanol en sangre (serie 1: rango 0.05-2.02 g/l, n=6; series 2 y 3: rango 0.06-1.85 g/l, n=10), aunque también sin evidencias de dependencia al mismo.

En la serie 1, la influencia del PMD (rango de 2-62 h) y edad (18-50 años) se determinó en los componentes de la cascada de señalización de las MAPK en cerebro de un grupo de sujetos control similar al descrito (véase apartado de Experimentos preliminares para la detección de proteínas diana, figuras 11 y 12). Estas variables no alteraron la expresión de la AC-I en cerebro humano (véase Resultados, Artículo V). En otros experimentos preliminares del grupo se había estudiado la influencia de la edad (15-52 años) y del PMD (3-81 h) sobre los componentes de la vía de señalización del AMPc (PKA, CREB, pCREB) con resultados negativos (Odagaki *et al.*, 2001). Por otro lado, se estudió la influencia del PMD (rango de 5-102 h) en los componentes de la cascada de señalización apoptótica mediada a través del complejo Fas/FADD en cerebro de un grupo de 13 sujetos control similar al utilizado en las series 2 y 3 (véase apartado de Experimentos preliminares para la detección de proteínas diana, figura 13).

Experimentos en células SH-SY5Y

Para inducir la activación de ERK por morfina en lisados celulares, se utilizaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (véase detalles en el apartado donde se describen las muestras biológicas). Una vez obtenidas las células confluentes, se liberaron en DPBS (150 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl, 7.9 mM Na₂HPO₄, 0.1 mM

EDTA, pH 7.4), se centrifugaron (300 x g, 5 min), se resuspendieron en medio RPMI-1640 y se contaron. Para estudiar la inducción de la actividad de ERK (pERK1/2) por morfina, se expusieron alícuotas de las células SH-SY5Y a varias concentraciones de morfina (1 nM-100 μ M durante 5 min), o a una concentración determinada de morfina (1 μ M) durante 1-60 min (experimento de curso temporal). Para bloquear la activación basal de ERK1/2 por MEK1/2 y el efecto estimulador de la morfina sobre las isoformas del enzima, se pre-incubaron células con PD98059 (2-amino-3-metoxi-flavona, 50 y 100 μ M), un inhibidor selectivo de la MEK1/2 (Alessi *et al.*, 1995), o con vehículo (control, 0.1% de dimetil sulfóxido, DMSO), durante los 60 minutos previos al ensayo basal o la estimulación del fármaco. Las células SH-SY5Y tratadas farmacológicamente y las células control se resuspendieron finalmente en tampón de homogenización y se prepararon los homogenizados de las membranas para su uso siguiendo métodos rutinarios.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En esta investigación se emplearon varios protocolos, aunque similares, para preparar las muestras biológicas para la posterior detección y cuantificación de las proteínas de estudio por técnicas inmunológicas.

Homogenización de tejido cerebral de rata

Dependiendo de la proteína diana a analizar y de la necesidad o no de extraer proteínas de la región membranal se siguieron distintos protocolos de homogenización detallados a continuación:

Preparación de fracción citosólica: para la inmunodetección de las proteínas diana (Fas glicosilado de 48 kDa, Bcl-2 y NF-L) se siguió un protocolo previamente descrito (García-Sevilla *et al.*, 1997) con algunas modificaciones. Se homogenizaron entre 250-300 mg de corteza cerebral recién descongelada, durante 30 segundos, con 5 volúmenes de una solución tampón 10 mM Tris-HCl a pH 7.4, que contenía 150 mM NaCl, 0.03% Nonidet P-40 (NP-40), y los siguientes inhibidores de proteasas: 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 5 mM de iodoacetamida, 10 μ g/ml del inhibidor de tripsina/quimiotripsina y 1 μ g/ml de leupeptina así como de aprotinina. Posteriormente las muestras se sonicaron durante 10 segundos y se centrifugaron a 14,900 x g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sedimento, recuperando el sobrenadante del que se determinó su contenido proteico por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) como se

describe más abajo. Una alícuota (400 μ l) de sobrenadante se mezcló con 50 μ l de tampón 4 x A (160 mM Tris-HCl a pH 6.8 y 8% de dodecil sulfato sódico (SDS)), y con 50 μ l de tampón de carga para electroforesis (LB 10 x) (500 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 30% glicerol, 20% 2-mercaptoetanol, 0.02% azul de bromofenol), se hirvieron durante tres minutos (desnaturalización de las muestras), y se guardaron a -20°C hasta su uso (véase Resultados, Artículo I).

Preparación de membranas corticales: la extracción de proteínas de la fracción membranal se realizó siguiendo un protocolo previamente descrito (Ventayol *et al.*, 1997). Se homogenizaron entre 150-200 mg de corteza cerebral con una relación 1:20 (peso/volumen) en tampón frío de homogenización con 40 mM Tris-HCl pH 7.5, que contenía 1% de Tritón X-100, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 5 mM NaCl, y los inhibidores de proteasas PMSF (1 mM) y leupeptina (40 $\mu\text{g/ml}$). Las muestras se centrifugaron a 40,000 x g durante 45 minutos a 4°C . Se cogieron 200 μ l del sobrenadante resultante, se mezclaron con el mismo volumen de tampón de carga de electroforesis (LB 2 x), se hirvieron (desnaturalización de las muestras), y se guardaron a -20°C hasta su uso. Se determinó el contenido proteico mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) como se describe más abajo.

- Deglicosilación de Fas: en algunos experimentos, se incubaron membranas corticales de cerebro de rata (extraídas con Tritón X-100) en ausencia o presencia de la enzima N-glicosidasa F (15 unidades durante 3 h a 37°C) (Ozaita *et al.*, 1999), para caracterizar la naturaleza de las distintas proteínas relacionadas con el receptor Fas. Las membranas corticales control y pretratadas (N-glicosidasa F) se mezclaron con tampón de carga y se desnaturalizaron durante 4 minutos a 95°C antes de ser cargadas (véase apartado de Experimentos preliminares para la detección de proteínas diana, figura 7, y Resultados, Artículos II y III).
- Disociación de agregados de Fas: para la disociación de los agregados de Fas, se incubaron membranas corticales de rata (extraídas con Tritón X-100) en ausencia o en presencia de un reactivo lipofílico alquilante de grupos sulfhidrilo, la N-etilmaleimida (NEM) o N-metilmaleimida (NMM; 1 mM durante 1 h a 37°C), para bloquear los residuos de cisteína nativos (el dominio extracelular de Fas contiene 18 residuos de cisteína; Itoh *et al.*, 1991; Oehm *et al.*, 1992). Las membranas corticales control y pretratadas (NEM o NMM) se mezclaron con tampón de carga

y se desnaturalizaron durante 4 minutos a 95°C antes de ser cargadas (véase Artículo III).

Preparación de homogenado total: para inmunodetectar varias proteínas en homogenado total crudo se homogenizó media corteza parieto-occipital de rata en un tampón 50 mM Tris HCl, pH 6.8, con 1 mM de EDTA, 2% de SDS y varios inhibidores de proteasas (1.3 mM pefabloc, 10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml E64, 10 µg/ml antipaína y 10 µg/ml pepstatina A) en una proporción 1:15 (peso/volumen) durante dos series de 10 segundos. Las muestras se sometieron a un ciclo de sonicación de 10 segundos y las alícuotas obtenidas (homogenado total), previo cálculo proteico y ajuste de las proteínas a una concentración de 6 µg/µl (con tampón de homogenización), se combinaron con tampón de carga (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 2.5 % β-mercaptoetanol y 0.1 % de azul de bromofenol) hasta conseguir que las muestras tuvieran una concentración de proteínas final igual a 3 µg/µl. Una vez ajustadas las proteínas se desnaturalizaron las muestras calentándolas durante 4 minutos a 95°C y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización. El contenido proteico se determinó como se describe más abajo (BCA, Protein Assay Reagent).

Defosforilación enzimática: la defosforilación enzimática de FADD se llevó a cabo como describieron Ferrer-Alcón y colaboradores (2000) con ciertas modificaciones. Se homogenizaron cortezas parieto occipitales de ratas control en 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 mM MgCl₂, 2% SDS, y varios inhibidores de proteasas (cóctel descrito previamente). La mezcla se sonicó durante 3 ciclos de 5 segundos y se realizaron 2 alícuotas, una con el homogenado total, y otra que se sometió a una centrifugación de 40,000 x g durante 15 minutos a 4°C, y se recogió la fracción sobrenadante (S2). Alícuotas de homogenado total y de sobrenadante se incubaron durante 15 minutos a 30°C en ausencia (control) o en presencia de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (95 U.I., 38 µg, Sigma). Otras alícuotas a las que también se adicionó el enzima fueron incubadas con 100 mM de pirofosfato sódico (control inhibido). Al acabar la incubación, la reacción se terminó añadiendo 100 mM de pirofosfato sódico al control y a las muestras con fosfatasa alcalina. Finalmente las muestras se procesaron para ser analizadas por SDS-PAGE (véase apartado de Experimentos preliminares para la detección de proteínas diana, figura 9 B).

Fraccionamiento subcelular: en otra serie de experimentos se investigó la localización subcelular del FADD. Para ello, se homogenizó una corteza parieto-occipital en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.32 M de sacarosa y 0.25 mM de PMSF (inhibidor de proteasas) en un polytron (n° 6), durante 2 x 10 segundos, a 4°C. Se guardó una alícuota de homogenado total a -80°C. El resto de homogenado total se centrifugó a 1,150 x g (Sorvall SS-34) durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante (S1) por decantación en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 20,500 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante (S2) se alicuotó y guardó a -80°C. Por otra parte, el pellet sinaptosomal crudo (P2) se resuspendió en 2 ml de 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5 con 0.25 mM de PMSF (tampón sin sacarosa). La fracción P1 se resuspendió en el mismo volumen inicial (10 ml de tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.32 M de sacarosa y 0.25 mM de PMSF) y se centrifugó durante 10 minutos a 1,150 x g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y la fracción nuclear cruda se resuspendió en 5 ml de tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.32 M de sacarosa y 0.25 mM de PMSF junto con 26 ml de tampón 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 2.39 M de sacarosa, y 0.25 mM de PMSF. Se centrifugó a 47,700 x g durante 45 minutos a 4°C. La fracción nuclear resultante (precipitado) se recogió cuidadosamente de las paredes del tubo de centrifuga (adherido a ellas) y se resuspendió en 1 ml de tampón 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5 con 0.25 mM de PMSF. Se guardó a -80°C. Una vez recogidas todas las fracciones se realizó una determinación del contenido proteico de las mismas (BCA) y se prepararon las muestras para ser analizadas mediante SDS-PAGE (véase apartado de Experimentos preliminares para la detección de proteínas diana, figura 9 C).

Homogenización de tejido cerebral de ratón

Las muestras cerebrales de ratón (homogenado total crudo) se prepararon como se describió previamente para las muestras de cerebro de rata (ver sección anterior) con ligeras modificaciones. Para medir las proteínas diana, se homogenizaron 150-200 mg de corteza cerebral o 30-60 mg de estriado en (1:7.5, peso/volumen) 50 mM de tampón Tris-HCl, pH 6.8, que contenía 1 mM de EDTA, 2% de SDS y varios inhibidores de proteasas (1.3 mM pepabloc, 10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml E64, 10 µg/ml antipaína y 10 µg/ml pepstatina A) (Ferrer-Alcón *et al.*, 2000), y la mezcla se sonicó durante 10 segundos. Las alícuotas obtenidas (homogenado total que contiene el citoesqueleto) se combinaron con tampón de carga (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 2.5 % β-mercaptoetanol y 0.1 % de azul de bromofenol) hasta conseguir que las muestras tuvieran

una concentración de proteínas final igual a 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Una vez ajustadas las proteínas se desnaturalizaron las muestras calentándolas durante 4 minutos a 95°C y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. El contenido proteico se determinó como se describe más abajo (BCA, Protein Assay Reagent).

Homogenización de tejido cerebral humano

Para inmunodetectar las proteínas de estudio se homogenizaron entre 200-250 mg de corteza prefrontal humana en un tampón 50 mM Tris HCl, pH 6.8, con 1 mM de EDTA, 2% de SDS y varios inhibidores de proteasas (1.3 mM pefabloc, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ E64, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipaína y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatina A) en una proporción 1:15 (peso/volumen) durante dos series de 10 segundos. Las muestras se sometieron a un ciclo de sonicación de 10 segundos y las alícuotas obtenidas (homogenado total), previo cálculo proteico y ajuste de las proteínas a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, se combinaron con tampón de carga (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 2.5 % β -mercaptoetanol y 0.1 % de azul de bromofenol) hasta conseguir que las muestras tuvieran una concentración de proteínas final igual a 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Una vez ajustadas las proteínas se desnaturalizaron las muestras calentándolas durante 4 minutos a 95°C y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. El contenido proteico se determinó como se describe más abajo (BCA, Protein Assay Reagent).

Determinación de proteínas

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, para la determinación del contenido proteico de las muestras se utilizó alguno de los tres métodos descritos brevemente a continuación, tomando como criterio de elección los reactivos y/o los detergentes utilizados en la homogenización y su posible interacción con el método de detección.

Método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

Se preparó una curva patrón a partir de una solución de albúmina bovina sérica (BSA) (Pierce) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se valoraron 5 puntos de concentración en un intervalo de entre 24 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preparados en NaOH 1 N hasta completar un volumen de 0.5 ml. También se preparó un blanco (0.5 ml de NaOH 1 N). Para preparar las muestras, se tomaron 50 μl de los homogenados, y se completó el volumen hasta 0.5 ml con NaOH 1 N. Todos los tubos (patrones y muestras) se prepararon por duplicado. Tanto a los patrones, al blanco, como a las muestras se les adicionó 5 ml de una solución

compuesta por 2% de tartrato sódico-potásico, 1% de $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 2% de Na_2CO_3 . Tras agitación y 10 minutos en reposo a temperatura ambiente, se les adicionó 0.5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu al 50%. Se realizó una nueva agitación, y se dejaron las muestras incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los valores de absorbancia se midieron en un espectrofotómetro (Pye Unicam) a una longitud de onda (λ) de 650 nm. Para calcular los valores proteicos de las muestras se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos sobre la curva patrón correspondiente para cada determinación, utilizando el programa de análisis no lineal LOWRY (McPherson, 1985).

Método de Bradford (Bradford, 1976)

Se preparó una curva patrón (7 puntos, con un intervalo de concentración entre 1 y 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a partir de una solución de albúmina bovina sérica (BSA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Pierce). A cada concentración de la curva patrón, se le añadió 5 μl del tampón utilizado en la preparación de las muestras (para tener la misma concentración de detergentes en el patrón y en las muestras) y agua mili-Q (bidestilada) hasta un volumen de 1 ml. Para preparar las muestras, se tomaron 5 μl de los homogenados, y se completó el volumen hasta 1 ml con agua mili-Q. Tanto las muestras como los patrones se valoraron por duplicado. A continuación, se adicionó 1 ml del reactivo de Bradford y tras agitación, los valores de absorbancia se midieron en un espectrofotómetro (Pye Unicam) a 595 nm frente al blanco de reactivo. Los valores proteicos de las muestras se calcularon por interpolación de los valores de absorbancia obtenidos sobre la curva patrón correspondiente a cada determinación. Para esta interpolación se utilizó el programa de análisis no lineal LOWRY (McPherson, 1985).

Método del Ácido Bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985)

Las concentraciones de proteína se determinaron frente a unos estándares de proteína albúmina bovina sérica (BSA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Se construyó una curva patrón, con diluciones de concentración conocida. Por otro lado, se sembraron 5 μl de las muestras y se les añadió agua mili-Q hasta completar un volumen de 100 μl . Tanto las muestras como el patrón se valoraron por duplicado. A continuación, se añadieron 2 ml de reactivo BCA (mezcla del reactivo A + reactivo B en una proporción 50:1). Tras agitar los tubos, se incubaron 30 minutos a 37°C en agitación. Se dejaron enfriar un par de minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf. Hamburg, Alemania) a 562 nm frente a un blanco de reactivo. Los valores proteicos de las muestras se

obtuvieron por interpolación de los valores de absorbancia obtenidos sobre la curva patrón correspondiente a cada determinación. Esta interpolación la calcula directamente el espectrofotómetro proporcionando la cantidad de proteína de cada muestra.

Efecto del proceso congelación-descongelación de las muestras

Por lo general, las alícuotas de muestra preparadas se utilizan varias veces en experimentos sucesivos de “Western Blotting” (véase apartado más abajo), sufriendo procesos de congelación-descongelación que podrían alterar las cantidades de proteína presentes en la muestra. Por ello, se investigó el efecto temporal que este proceso de congelación-descongelación inducía sobre la inmunoreactividad de Fas. Se utilizó un sobrenadante control obtenido al homogenizar una corteza cerebral de rata. Se preparó una serie de diez alícuotas (del 1 al 10), donde el número de alícuota indicaba el número de ciclos de congelación-descongelación a los que se sometía la muestra. Cada alícuota se mezcló con el mismo volumen de tampón de carga de electroforesis (LB 2 x), se hirvió (desnaturalización de las muestras), y se guardó a -20°C hasta su uso. Se había demostrado anteriormente que los ciclos de congelación-descongelación de muestras cerebrales ya preparadas provocan una pérdida en la inmunoreactividad de la proteína del neurofilamento NF-L en cerebro humano *postmortem* (Grange-Midroit *et al.*, 2002). Por ello, al iniciar estos experimentos con muestras de corteza cerebral de rata, se comprobó el efecto de la congelación-descongelación de las muestras sobre la inmunoreactividad de Fas (48 kDa) y de NF-L. Se encontró que tanto la proteína Fas glicosilada (48 kDa) como el NF-L (68 kDa) perdían inmunoreactividad a medida que se sometían las muestras a ciclos de congelación-descongelación (véase figura 2). La pérdida observada en la proteína Fas fue más pronunciada que la del NF-L.

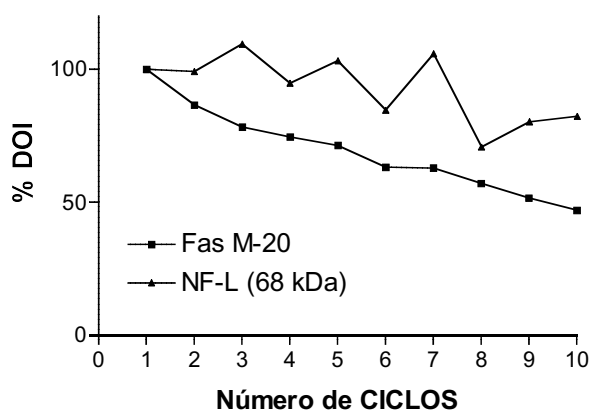


Figura 2. Efecto de los ciclos congelación-descongelación de las muestras sobre la inmunoreactividad de las proteínas Fas (forma glicosilada de 48 kDa) y NF-L (68 kDa). Se utilizó un sobrenadante control obtenido al homogenizar una corteza cerebral de rata. Se prepararon una serie de diez alícuotas, donde el número de alícuota (1-10) indicaba el número de ciclos de congelación-descongelación al que se sometieron las muestras. Cada alícuota se mezcló con el mismo volumen de tampón de carga de electroforesis (LB 2 x), se hirvió (desnaturalización), y se guardó a -20°C hasta su uso. Todas las muestras (ciclos 1-10) se analizaron simultáneamente.

A la luz de estos resultados, se decidió en los experimentos de este trabajo de Tesis doctoral utilizar y reutilizar las muestras únicamente 4 ó 5 veces. Con este número de ciclos de congelación-descongelación la pérdida en la inmunoreactividad fue como máximo de un 20% (para muestras control y muestras experimentales). Así, para cada tanda experimental se aseguró que las diferencias observadas en la inmunoreactividad de la proteína de interés se debían exclusivamente al efecto del tratamiento y no a una pérdida de expresión provocada por los ciclos de congelación-descongelación.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DIANA MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS (“WESTERN BLOTTING”)

El “Western Blotting” (WB) es una técnica muy poderosa, ampliamente utilizada para la detección e identificación de proteínas usando anticuerpos. El proceso conlleva varios pasos: la separación electroforética (por pesos moleculares) de las proteínas presentes en la muestra; la transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana de nitrocelulosa, soporte que une e inmoviliza las proteínas con el mismo patrón que presentaba el gel original; y la exposición de la membrana con una solución que contiene los anticuerpos que reconocen y se unen a la proteína específica de interés. La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE (“Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”) (Laemmli, 1970) es el método analítico más usado para separar los distintos componentes de una mezcla de proteínas.

Condiciones experimentales de la electroforesis en geles de poliacrilamida y “Western Blotting”

Para los ensayos de electroforesis y WB se prepararon geles discontinuos de poliacrilamida. El gel concentrador, “stacking gel”, se preparó con 4% de acrilamida/bis-acrilamida (de un stock al 30% de acrilamida y al 0.8% de bis-acrilamida), 166 mM de Tris-HCl pH 6.8 (de un stock 1 M Tris-HCl pH 6.8), 0.1% de SDS (de un stock al 10%), 0.2% de persulfato de amonio (APS, preparado diariamente), y 0.08% de TEMED. Para preparar el gel resolutorio, “resolving gel”, según la proteína de interés y su peso molecular (véase tabla 8), se adicionó entre un 8% y un 15% de acrilamida-bis-acrilamida, ya que, la elección de la concentración del gel determina el rango de separación efectivo de las proteínas en la electroforesis SDS-PAGE. Además se adicionó 0.75 M de Tris-HCl pH 8.8 (de un stock 3 M Tris-HCl pH 8.8), 0.1% de SDS, 0.05% de

APS, y 0.05% de TEMED. Con estos rangos de concentración de acrilamida se pudieron separar proteínas cuyo tamaño molecular se encontraba en un intervalo de 15 a 200 kDa.

Para preparar los minigeles de poliacrilamida (entre 8-15% de acrilamida) se utilizaron los soportes Mini-Protean[®] 2 Cell o Mini-Protean[®] 3 Cell (minigeles de 6 x 8 cm de 1 mm de grosor, o minigeles de 7 x 10 cm, 1.5 mm de grosor) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). En el gel concentrador se introdujeron unos peines de Teflón TM de 1 mm o de 1.5 mm de grosor, según el minigel utilizado, que formaron los 15 carriles donde se cargaron las distintas muestras.

En experimentos rutinarios se prepararon las muestras (véase apartado de Preparación de las muestras) a una concentración tal, que permitió cargar un volumen de muestra de entre 10 y 30 μ l por carril. Para caracterizar y cuantificar las proteínas de estudio, se cargaron 40 μ g de homogenado cerebral de rata, de ratón, y de humano, o 20 μ g de proteína para las células SH-SY5Y. Junto a las muestras se sembraron 5 μ l de un estándar coloreado (Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range, Bio Rad) que presentaba siete proteínas marcadoras, con pesos moleculares comprendidos entre 7 y 200 kDa aproximadamente.

El tampón de electroforesis se compuso de 25 mM Tris-HCl pH 8.5-8.6, 0.2 M de glicina, y 0.1% de SDS. Entre los electrodos se aplicó una tensión eléctrica inicial de 70-80V, mientras las muestras se apilaban en el gel concentrador, y de 100-120V durante la migración por la zona de separación-resolución. Cuando el frente de la electroforesis (marcado por el compuesto azul de bromofenol) salió del gel de poliacrilamida, se dio por finalizada la electroforesis (tiempo aproximado de 2-3 horas).

Seguidamente, las bandas proteicas se transfirieron a un medio más estable y rígido como es una membrana de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell, Alemania). Según el tamaño de la proteína a transferir, se utilizó una membrana con un diámetro de poro de 0.2 μ m (para la inmunodetección de Bcl-2) o de 0.45 μ m (para la inmunodetección del resto de proteínas de mayor peso molecular). En cada experimento se marcaron las membranas para poder ser posteriormente reconocidas. La transferencia se realizó, como se describe en el procedimiento de Towbin (Towbin *et al.*, 1979), aplicando un campo eléctrico perpendicular al plano del gel, proceso conocido como “western blot”, de donde proviene el nombre de la técnica. En la cubeta de transferencia, se preparó el casete de transferencia siguiendo las recomendaciones del fabricante (Bio Rad, Hercules, CA). Para

ello, el gel y la membrana de nitrocelulosa se ponen en contacto cubiertos por papel de filtro (3 MM Whatman) y esponjas, que ayudan a mantener el sistema unido bajo presión en el casete de transferencia (véase figura 3).

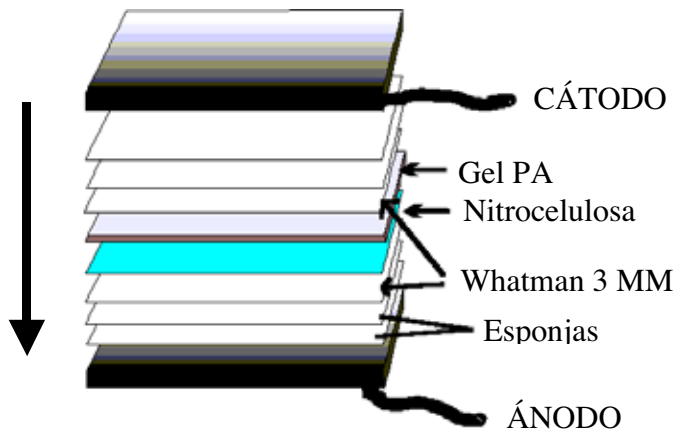


Figura 3. Casete de transferencia. Se ponen en contacto el gel de PA (poliacrilamida) con la membrana de nitrocelulosa, cubiertos por papel de filtro Whatman (3 MM) y las esponjas compresoras.

La transferencia normalmente se realizó a 110 voltios durante 2 horas y media en tampón de transferencia (25 mM de Tris-HCl pH 8.3, 0.19 M de glicina, y 20% de metanol), manteniendo la cubeta de transferencia a 4°C durante todo el proceso, aunque en otras condiciones, se realizó durante toda la noche a 40 voltios y en nevera. El metanol se adicionó para incrementar la capacidad de unión de la membrana de nitrocelulosa. Para transferir proteínas de elevado peso molecular (agregados de Fas), se adicionó 0.1% de SDS al tampón de transferencia que proporcionó una mejora en el proceso.

Para comprobar si la transferencia de las proteínas se ha producido correctamente el uso de marcadores de peso molecular coloreados (descritos previamente), que muestran bandas coloreadas visibles durante la electroforesis y sobre la membrana, proporciona un rápido control de la eficiencia del proceso, e indica el lado de la membrana al cual se han adherido las proteínas.

Al finalizar la transferencia, se extrajeron las membranas del casete de transferencia y se lavaron para eliminar el exceso de metanol durante cinco minutos con un tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS: 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 12 mM de Na₂HPO₄, 1.38 mM de KH₂PO₄) o con un tampón Tris salino pH 7.6 (TBS: 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl) (según la proteína a determinar, véase tabla 8). Previamente a la incubación con los anticuerpos se procedió al bloqueo de los lugares de fijación inespecífica, para evitar así el posible ruido de fondo (“background”). Se incubaron las membranas a temperatura ambiente durante una hora en una solución bloqueadora que contenía 5% de leche en

polvo desnatada, 0.5% de albúmina bovina sérica (BSA), y 0.2% de Tween-20 (T-20, monolaureato de polioxietileno-sorbitan, detergente que ayudaba a eliminar el ruido de fondo de la membrana), en tampón PBS. Para las proteínas fosforiladas la solución bloqueadora contenía 5% de leche en polvo desnatada, y 0.1% de T-20 en tampón TBS. Las membranas incubadas en esta leche bloqueadora se lavaron 3 veces durante cinco minutos en tampón T-TBS (TBS con 0.1% de T-20) antes de ser incubadas con el anticuerpo primario.

Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C en una solución bloqueadora que contenía el anticuerpo primario de interés. Según la proteína a determinar la solución bloqueadora contenía 5% leche, 0.5% BSA, 0.2% de T-20 en PBS, o bien, 5% BSA en T-TBS (véase tabla 8).

Los anticuerpos anti-Fas utilizados no mostraron reacciones cruzadas con los otros receptores transmembrana de la superfamilia TNF (datos del fabricante). Para testar la selectividad de estos anticuerpos anti-Fas (M-20 y C-20) con sus proteínas específicas, se preincubaron en exceso los péptidos antigénicos (sc-716P y sc-715P, Santa Cruz Biotechnology) con el antisero correspondiente, bloqueando así la unión del anticuerpo con las proteínas específicas de las especies testadas (véase apartado de Experimentos preliminares para la detección de proteínas diana, figura 5). También se comprobó la especificidad y selectividad de la mayoría de los anticuerpos primarios descritos en la tabla (no se muestran los datos excepto para el FADD, véase apartado de Experimentos preliminares para la detección de proteínas diana, figuras 9 y 10). Para las proteínas de las que no se dispuso del péptido antigénico, se usó como control negativo la omisión del anticuerpo primario. En estas condiciones hubo ausencia de inmunoreactividad (véase ejemplo en Resultados, Artículo I).

Tras tres lavados de 10 minutos en agitación con PBS o con T-TBS, las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (producido contra la especie en la cual se obtuvo el anticuerpo primario que es capaz de reconocer el epítipo del anticuerpo primario). El anticuerpo secundario se preparó en la solución bloqueadora, previamente descrita (leche con T-PBS o leche con T-TBS). Se utilizaron tres tipos de anticuerpos secundarios, los constituidos por inmunoglobulinas de burro anti-inmunoglobulinas de conejo (NA 934, Amersham), por inmunoglobulinas de oveja anti-inmunoglobulinas de ratón (NA 931, Amersham), o por inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de cabra (A 5420, Sigma), según el anticuerpo primario utilizado y

la especie en la cual se obtuvo, diluido entre 1:2000 y 1:5000 en solución bloqueadora (véase tabla 8).

Tabla 8. Condiciones experimentales para los ensayos de “Western Blot”.

Proteína	Anticuerpo	Peso molecular (kDa)	% acrilamida	Bloqueo y lavados	Dilución anticuerpo primario	Dilución anticuerpo secundario
Receptor Fas	M-20	35, 48, 51, 120, 203	10%	PBS	1:750 y 1:2000	anti-conejo-HRP (1:5000)
	C-20	51	10%	PBS	1:2000	anti-conejo-HRP (1:5000)
	FL-335	51	10%	PBS	1:1000	anti-conejo-HRP (1:5000)
FADD	H-181	51-75	10%	PBS	1:5000	anti-conejo-HRP (1:5000)
	N-18	25, 51-75	10%	PBS	1:1000	anti-cabra-HRP (1:5000)
	BD-1	25, 51-75	10%	PBS	1:2000	anti-ratón-HRP (1:5000)
Caspasa-8 p20	H-134	55	15%	PBS	1:1000	anti-conejo-HRP (1:5000)
Caspasa-3	H-277	32	15%	T-TBS	1:2000	anti-conejo-HRP (1:5000)
Bcl-2	AC 21	28	12%	PBS	1:2000	anti-conejo-HRP (1:5000)
NF-L	NR4	68	“Stripping” de Bcl-2	PBS	1:500	anti-ratón-HRP (1:2000)
Gα₂	L5	40	12%	PBS	1:1000	anti-ratón-HRP (1:5000)
AC-I	V-20	135	12%	PBS	1:1000	anti-conejo-HRP (1:5000)
PKA-Cα	C-20	42	12%	T-TBS	1:100000	anti-conejo-HRP (1:5000)
pCREB	Ser133	43	12%	T-TBS	1:5000	anti-conejo-HRP (1:2000)
CREB	06-863	43	“Stripping” de pCREB	PBS	1:5000	anti-conejo-HRP (1:5000)
Ras	R02120	21	12%	PBS	1:1000	anti-ratón-HRP (1:5000)
c-Raf-1	R19120	74	8%	PBS	1:1000	anti-ratón-HRP (1:5000)
pMEK1/2	Ser217/221	45	8%	T-TBS	1:1000	anti-conejo-HRP (1:2000)
MEK1/2	9120	45	“Stripping” de pMEK1/2	PBS	1:3000	anti-conejo-HRP (1:5000)
pERK1/2	Thr202/Tyr204	42-44	8%	T-TBS	1:3000	anti-conejo-HRP (1:2000)
ERK1/2	442704	42-44	“Stripping” de pERK1/2	PBS	1:1000	anti-conejo-HRP (1:5000)
Elk-1	9182	45	10%	T-TBS	1:500	anti-conejo-HRP (1:3000)
β-actina	A 1978	42	10%	PBS	1:10000	anti-ratón-HRP (1:2000)
α-tubulina	B-5-1-2	50	10%	PBS	1:2000	anti-ratón-HRP (1:5000)
Dinamina	D25520	100	10%	PBS	1:2000	anti-ratón-HRP (1:5000)

Los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados a un sistema de detección, en este caso a un enzima (peroxidasa de rábano), que al reaccionar con un substrato específico produce una señal final cuantificable. Después de tres lavados en PBS o en T-TBS de 10 minutos se cuantificó la inmunoreactividad de la proteína de interés por el sistema de detección detallado a continuación.

La detección de la actividad peroxidasa se realizó mediante un sistema de quimioluminiscencia amplificada (ECL, Amersham). Es un método de emisión de luz no radioactiva para la detección de antígenos específicos inmovilizados, directa o

indirectamente, en una membrana de nitrocelulosa, con anticuerpos marcados con una peroxidasa de rábano (HRP). Es un sistema de detección de elevada sensibilidad (al menos 10 veces más sensible que sistemas de detección colorimétricos o radioactivos), y de elevada resolución (genera señales con un buen contraste) (figura 4 A).

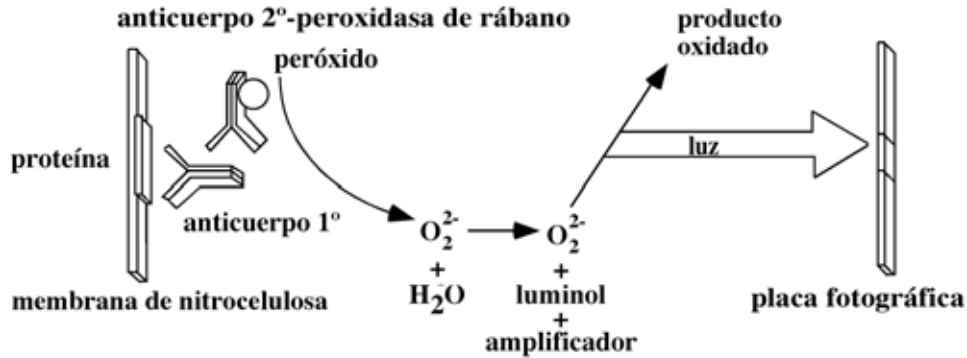


Figura 4 A. Detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando los reactivos ECL. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron en presencia del anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Tras una serie de lavados de 10 minutos en PBS o T-TBS, las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo secundario conjugado con el enzima peroxidasa de rábano, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las señales de quimioluminiscencia se detectaron al incubar las membranas con los reactivos ECL y exponerlas a una película fotográfica.

El sistema HRP (anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano)/H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) cataliza la oxidación del luminol (sustrato luminiscente, es una diacilhidracida cíclica) en condiciones alcalinas (figura 4 B).

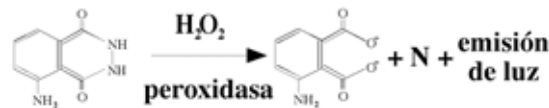


Figura 4 B. Reacción de oxidación del luminol (diacilhidracida cíclica) por acción del peróxido de hidrógeno H₂O₂ catalizada por la peroxidasa de rábano. Tras la oxidación, el luminol se encuentra en un estado excitado provocando la emisión de luz al volver a su estado inicial.

La luz producida por esta reacción de quimioluminiscencia amplificada presenta un máximo de intensidad a los 5-20 minutos para, a partir de este tiempo, empezar a decaer lentamente, presentando una semivida de aproximadamente 60 minutos (figura 4 C).

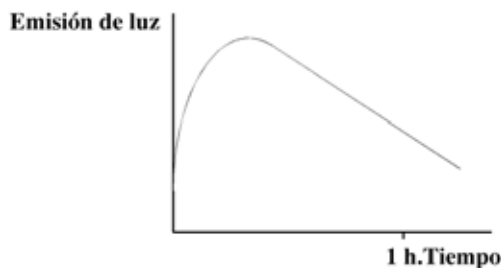


Figura 4 C. La luz producida por este sistema alcanza un máximo de emisión a los 5-20 minutos, y decae lentamente con una semivida de aproximadamente una hora.

La emisión máxima de luz, que se produce a una longitud de onda de 428 nm, puede ser detectada al poner en contacto las membranas de nitrocelulosa (previamente incubadas durante 2 minutos con los ECLs) con una película fotográfica sensible a la luz azul (Hyperfilm-ECL, Amersham), durante un período corto de tiempo (entre 30 segundos y 10 minutos) (autorradiogramas). Este sistema de detección permite detectar proteínas específicas en menos de un minuto. Las bandas específicas obtenidas en la película fotográfica (“film”) se cuantifican en un densitómetro.

Para la inmunodetección de la proteína Bcl-2 se utilizó un sistema más sensible denominado ECL-Plus (Amersham Pharmacia Biotechnology). Es un método no radioactivo mejorado que sirve para detectar antígenos específicos inmovilizados, conjugados con anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano (HRP). Utiliza una nueva tecnología desarrollada por Lumigen Inc. basada en la generación enzimática de un éster acridinio que es capaz de generar una emisión de luz más intensa y duradera.

El sistema proporciona niveles de sensibilidad mejorados, entre 10 y 20 veces los obtenidos por ECLs, con un resultado equivalente dependiendo del sistema usado. Además, la duración de la señal con el ECL-Plus permite tener exposiciones exitosas incluso 24 horas después del inicio de la reacción de detección.

Reciclado de las membranas de nitrocelulosa (“Stripping”)

Una vez expuesta la membrana de nitrocelulosa a la película fotográfica, ésta se puede volver a utilizar eliminando los anticuerpos primario y secundario mediante el método denominado “stripping” para poder testar nuevos anticuerpos sobre ella. Así, las mismas membranas de nitrocelulosa previamente usadas para la inmunodetección de las proteínas Fas y Bcl-2 se utilizaron para la inmunodetección de la proteína del neurofilamento de 68 kDa (NF-L), proteína específica del citoesqueleto neuronal que se utilizó como control positivo de los efectos celulares provocados por la administración de morfina (Boronat *et al.*, 1998; Jaquet *et al.*, 2001) (véase tabla 8, “Stripping”). Este protocolo también se utilizó para inmunodetectar las proteínas totales CREB, MEK y ERK, en las membranas en las que previamente se habían detectado las formas fosforiladas.

Brevemente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos en tampón salino fosfato (PBS, previamente descrito), y se incubaron en agitación durante 30 minutos a 50°C en tampón de “stripping” (62.5 mM de Tris-HCl pH 6.8, 100 mM de 2-mercaptoetanol, 2% SDS). Después de dos lavados rápidos con PBS y otros tres de 10

minutos cada uno, las membranas se bloquearon 1 h a temperatura ambiente con solución bloqueadora (5% leche, 0.5% BSA y 0.2% T-20), para reincubarlas con el nuevo anticuerpo durante la noche (“reprobing”).

Experimentos preliminares para optimizar la detección de proteínas diana

Detección de Fas nativo (35 kDa) y glicosilado (48 y 51 kDa) en tejidos cerebrales y en células SH-SY5Y

La proteína Fas ha sido descrita como un receptor de superficie celular ampliamente expresado, tanto en forma nativa que presenta una masa molecular relativa de ~35 kDa, como en sus formas glicosiladas que oscilan entre ~45-52 kDa (Itoh *et al.*, 1991; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). Estas formas de Fas no han sido descritas en cerebro de mamíferos, exceptuando lo ya reseñado en este trabajo.

Para la caracterización e inmunodetección de las proteínas relacionadas con Fas, se ensayaron inicialmente anticuerpos dirigidos contra el dominio citoplasmático de Fas (M-20 y C-20), en membranas cerebrales de rata, ratón y humano, así como en membranas de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano (para estos ensayos no se adicionó detergente en la preparación de las muestras).

En homogenados de cerebro de rata, el anticuerpo Fas M-20 inmunodetectó proteínas específicas de 35 kDa (Fas nativo) y de 48 y 51 kDa (formas glicosiladas de Fas) (figura 5 A). La proteína cuantificada en los experimentos iniciales correspondió con la forma glicosilada de 48 kDa (véase Resultados, Artículo I). Al preincubar el anticuerpo Fas M-20 con su péptido antigénico (inactivación del anticuerpo) se bloqueó la inmunoreactividad para las proteínas específicas (35, 48 y 51 kDa), pero no para otras proteínas (péptidos desconocidos no relacionados con Fas) de mayor masa molecular (~65 kDa) (figura 5 A). Se obtuvieron resultados similares para muestras de cerebro de ratón y humano (incluidos dos péptidos prominentes de ~45 kDa, posiblemente relacionados con las formas glicosiladas de Fas) así como para las células SH-SY5Y (figura 5 A).

En tejidos cerebrales de rata, ratón y humano, así como en las células SH-SY5Y, el anticuerpo Fas C-20 marcó una proteína específica de 51 kDa (forma glicosilada de Fas), ya que tras la inactivación del anticuerpo con su péptido antigénico no se inmunodetectó esta forma de Fas (figura 5 B). En estos tejidos y preparaciones celulares el anticuerpo Fas C-20 también inmunodetectó una banda específica a ~97 kDa (no se muestra), que

probablemente represente una forma procesada de agregados de Fas (~110-200 kDa; Kamitani *et al.*, 1997).

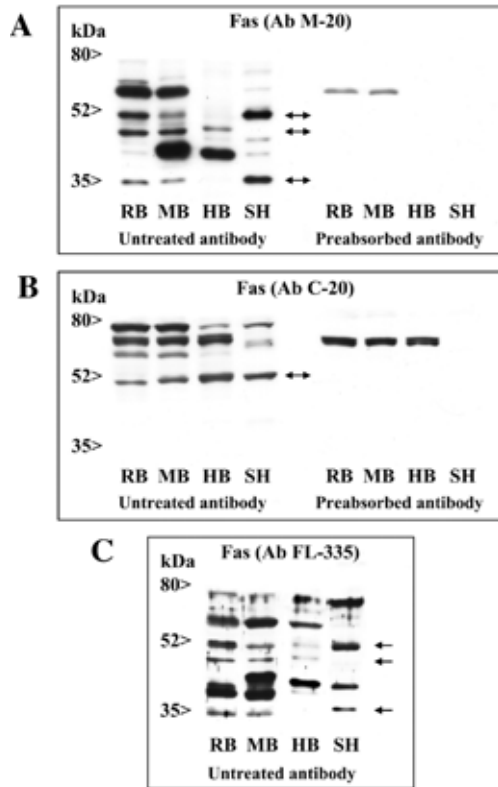


Figura 5. Autorradiogramas representativos (“immunoblots”) de las proteínas relacionadas con Fas (forma nativa de 35 kDa y formas glicosiladas de 48 y 51 kDa, flechas) con varios anticuerpos (**A:** M-20, **B:** C-20 y **C:** FL-335) en cerebro de rata (RB, corteza cerebral), de ratón (MB, corteza cerebral) y en cerebro humano (HB, corteza prefrontal), así como en células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y (SH). Se cargaron 40 µg de proteína para cada muestra cerebral y 20 µg proteína para células SH. La especificidad de los anticuerpos Fas M-20 y C-20 se testó inactivando el correspondiente anticuerpo con su péptido antigénico, lo que conllevó al bloqueo de las inmunodensidades de las proteínas específicas (dobles flechas). Las masas moleculares aparentes de Fas se determinaron al calibrar los “immunoblots” con marcadores preteñidos de peso molecular conocido. Para cada uno de los anticuerpos todas las muestras se cargaron en el mismo gel.

(Tomado del Artículo II, García-Fuster *et al.*, 2003)

Posteriormente, en cerebro de rata, ratón y humano, y en células SH-SY5Y, se inmunodetectó con el anticuerpo Fas FL-335 (dirigido contra la proteína total; péptido antigénico no disponible) un patrón para Fas (formas nativa y glicosiladas) similar al observado para Fas M-20, pero con más ruido de fondo (“background”) (figura 5 C).

Así, mediante el uso de varios anticuerpos contra epítopos independientes del receptor (M-20, C-20, FL-335), se identificaron las mismas proteínas específicas relacionadas con Fas (forma nativa de 35 kDa y formas glicosiladas de 48 y 51 kDa) en cerebro de rata.

Por otra parte se observó que en membranas de corteza cerebral de rata, extraídas con Tritón X-100 y testadas con el anticuerpo Fas M-20, se incrementó la inmunodensidad de la forma glicosilada de Fas de 48 kDa con una reducción de la forma de 51 kDa (véase figura 6).

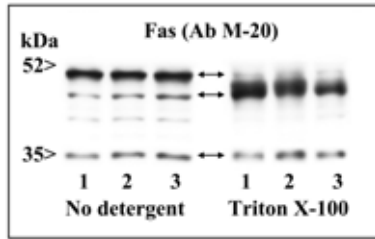


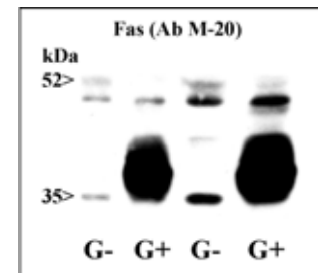
Figura 6. “Inmunoblots” representativos de Fas (forma nativa de 35 kDa y formas glicosiladas de 48 y 51 kDa, doble flecha) con el anticuerpo Fas M-20 en cerebro de rata (corteza cerebral). Las muestras (40 μ g de proteína, tres animales por grupo) se prepararon en ausencia o presencia de un detergente no iónico (Tritón X-100). Obsérvese que la extracción de proteínas con Tritón mejoró la inmunodetección de la forma glicosilada de 48 kDa enmascarando la de 51 kDa.

(Tomado del Artículo II, García-Fuster *et al.*, 2003)

La extracción de proteínas con Tritón X-100 (detergente no iónico) también mejoró la inmunodetección de la forma nativa de Fas (35 kDa) (con el anticuerpo M-20), de la forma glicosilada de Fas de 51 kDa (con el anticuerpo C-20), y de las formas glicosiladas de Fas de 48 y 51 kDa (con el anticuerpo FL-335; véanse figuras 5 y 6).

Para comprobar la especificidad de las formas glicosiladas de Fas (48 y 51 kDa), se provocó la N-deglicosilación del receptor, la cual aumentó la expresión de la forma nativa de Fas (35 kDa) y la de sus péptidos relacionados (\sim 43/45 kDa; figura 7), y disminuyó la forma glicosilada del receptor de 51 kDa.

Figura 7. Inmunodetección de Fas (formas nativa y glicosiladas) con el anticuerpo Fas M-20 en corteza cerebral de rata después de la deglicosilación del receptor. Las muestras (18 y 36 μ g de proteína, preparadas con Tritón X-100) se incubaron en ausencia (G-) o en presencia (G+) de la enzima N-glicosidasa F (15 unidades durante 3 h a 37°C). Obsérvese que la N-deglicosilación del receptor Fas induce un marcado aumento en la expresión de la forma nativa de Fas (35 kDa) y de sus péptidos relacionados (\sim 43/45 kDa). Las masas moleculares aparentes de Fas se determinaron calibrando los “blots” con marcadores preteñidos de pesos moleculares conocidos como se muestra en el lado izquierdo del recuadro.



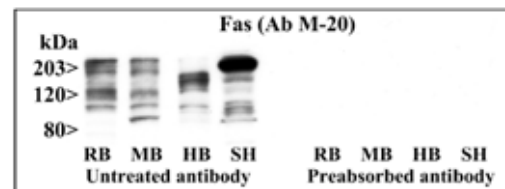
(Tomado del Artículo II, García-Fuster *et al.*, 2003)

Después de caracterizar el receptor Fas (forma nativa, 35 kDa, y formas glicosiladas, 48 y 51 kDa) en cerebro, se decidió estudiar los efectos de distintos fármacos opiáceos, así como de otros fármacos de interés, sobre estas proteínas diana en membranas cerebrales extraídas con Tritón X-100. Tras los distintos tratamientos, se cuantificó con el anticuerpo Fas M-20 la forma nativa de Fas (35 kDa) y la forma glicosilada de 48 kDa, mientras que con el anticuerpo Fas C-20 se cuantificó la forma glicosilada de Fas de 51 kDa. El anticuerpo Fas FL-335 se utilizó, en algunos experimentos, para cuantificar las dos formas glicosiladas de Fas (48 y 51 kDa) (véase Resultados, Artículo II).

Detección de formas agregadas de Fas (120 y 203 kDa) en tejidos cerebrales y en células SH-SY5Y

En membranas cerebrales de rata, ratón y humano, así como en las células humanas SH-SY5Y, se inmunodetectaron formas agregadas del receptor Fas (~110/120 y ~203 kDa) resistentes a las condiciones desnaturalizantes presentes en la muestra (SDS y β -mercaptoetanol) por análisis de “Western blot” (véase figura 8). Estos péptidos de elevado peso molecular son específicos de proteínas relacionadas con Fas ya que la preincubación del anticuerpo anti-Fas M-20 con su péptido antigénico (anticuerpo preabsorbido) resultó en el bloqueo de la inmunoreactividad de estas formas de Fas (figura 8), como ya ocurrió para las formas nativa (35 kDa) y glicosiladas (45-52 kDa) de Fas (véase figura 5 A).

Figura 8. “Inmunoblots” representativos de los agregados de Fas (~110/120 y ~203 kDa) con el anticuerpo anti-Fas M-20 en cerebro de rata (RB, corteza cerebral), de ratón (MB, corteza cerebral), y en cerebro humano (HB, corteza prefrontal), así como en células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y (SH). Se cargaron 40 μ g de proteína para tejidos cerebrales y 20 μ g proteína para células SH.



La especificidad del anticuerpo Fas M-20 se testó inactivando el anticuerpo con su péptido antigénico (anticuerpo preabsorbido), lo que conllevó al bloqueo de las inmunodensidades de los agregados de Fas. Las masas moleculares aparentes de los agregados de Fas se determinaron al calibrar los “inmunoblots” con marcadores preteñidos de peso molecular conocido. Para cada uno de los anticuerpos todas las muestras se cargaron en el mismo gel.

(Tomado del Artículo III, García-Fuster *et al.*, 2004)

La inmunodetección de estas formas de Fas de elevado peso molecular (agregados de 120 y 203 kDa) con el anticuerpo anti-Fas M-20, en membranas cerebrales de rata, ratón y humano, así como en las células humanas SH-SY5Y, está de acuerdo con resultados previos de otros grupos que describieron formas similares de agregados de Fas (estables en SDS y β -mercaptoetanol) en varias líneas celulares (Kischkel *et al.*, 1995; Kamitani *et al.*, 1997; Papoff *et al.*, 1999; Siegel *et al.*, 2000a).

Detección de la proteína de acople FADD en tejidos cerebrales

Para la caracterización e inmunodetección del FADD, se ensayaron varios anticuerpos dirigidos contra la secuencia aminoacídica 28-209 de la proteína (anti-FADD H-181), contra un péptido del extremo amino terminal (anti-FADD N-18) o contra la secuencia aminoacídica del dominio de muerte (anticuerpo monoclonal, Ab BD-1) en membranas cerebrales de rata, ratón y humano (para estos ensayos no se adicionó detergente en la

preparación de las muestras). En homogenados totales de cerebro de rata, ratón y humano, el anticuerpo anti-FADD H-181 inmunodetectó proteínas específicas de 51 a 75 kDa (figura 9 A), ya que al inactivar el anticuerpo con su péptido antigénico se bloqueó la inmunoreactividad para estas proteínas (véase figura 9 A). Se obtuvieron resultados similares para muestras de cerebro de rata, ratón y humano con el anticuerpo anti-FADD N-18 y con el anticuerpo monoclonal anti-FADD (véase figura 10 A y B).

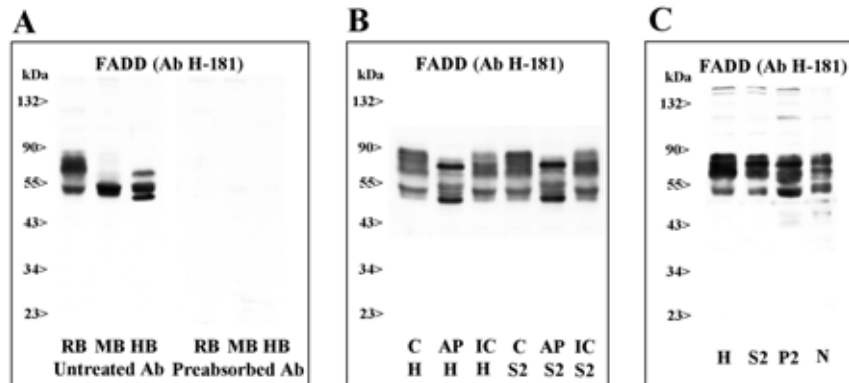


Figura 9 A. “Inmunoblot” representativo de la proteína FADD (~51-kDa) con el anticuerpo anti-FADD H-181 en cerebro de rata (RB, corteza cerebral), de ratón (MB, corteza cerebral), y en cerebro humano (HB, corteza prefrontal). Se cargaron 40 μ g de proteína para cada muestra. La especificidad del anticuerpo FADD H-181 se testó inactivando el anticuerpo con su péptido antigénico (anticuerpo preabsorbido), lo que conllevó al bloqueo de la inmunodensidad de la proteína FADD (forma desfosforilada y formas fosforiladas). **B.** “Inmunoblot” representativo de la especificidad del anticuerpo FADD H-181 por las formas desfosforiladas o fosforiladas de la proteína en tejido cerebral de rata. Se incubaron alícuotas de homogenado total (H) o de fracción citosólica (S2) en ausencia (C: control) o presencia (AP) de la enzima fosfatasa alcalina (95 U.I.) durante 15 min a 30°C. Al control inhibido (IC) también se le adicionó la enzima y pirofosfato sódico (100 mM). La reacción se terminó adicionado 100 mM de pirofosfato sódico a C y a AP. Las muestras se procesaron para ser analizadas por SDS-PAGE (40 μ g de proteína por carril). **C.** “Inmunoblot” representativo del fraccionamiento subcelular de la proteína FADD en corteza cerebral de rata. (H: homogenado total; S2: fracción citosólica; P2: fracción membranal; N: fracción nuclear). Las masas moleculares aparentes de FADD se determinaron al calibrar los “inmunoblots” con marcadores preteñidos de peso molecular conocido.

(Tomado del Artículo IV, García-Fuster *et al.*, 2005)

En experimentos preliminares, también se testó la especificidad del anticuerpo H-181 por formas desfosforiladas o fosforiladas de la proteína en “Western blots” de tejido cerebral de rata. La defosforilación de la proteína FADD con la fosfatasa alcalina (homogenado total y fracción citosólica) incrementó la reactividad de alguna de las bandas e indujo un cambio en la movilidad de las bandas (formas de 51 y 75 kDa), lo que indicó que este anticuerpo reacciona con la proteína FADD independientemente del estado de fosforilación de la proteína (véase figura 9 B). Por tanto, como se describió previamente para varias líneas celulares (Zhang y Winoto, 1996; Scaffidi *et al.*, 2000), la

proteína FADD en cerebro puede ser reconocida como una forma no fosforilada (de migración más rápida) y como una forma fosforilada (de migración más lenta).

El anticuerpo anti-FADD N-18, que reconoce el extremo N-terminal de la proteína, también inmunodetectó, aunque con una señal muy débil, otro péptido de unos 25-30 kDa que correspondió a la forma monomérica de la proteína (se comprobó la especificidad del anticuerpo inactivándolo con su péptido antigénico, figura 10 A). Por otro lado, el anticuerpo monoclonal anti-FADD (Ab BD-1) reconoció la forma monomérica de la proteína únicamente en tejido cerebral humano (identificada con un control positivo) mientras que en cerebro de rata y ratón sólo se reconoce la forma dimérica (figura 10 B). Estos resultados indican que la proteína FADD tiene la habilidad de formar agregados (Siegel *et al.*, 2000; Tourneur *et al.*, 2005), y que son estos agregados (homodímeros/trímeros), los que se expresan mayoritariamente en tejido cerebral (formas de 51 y 75 kDa).

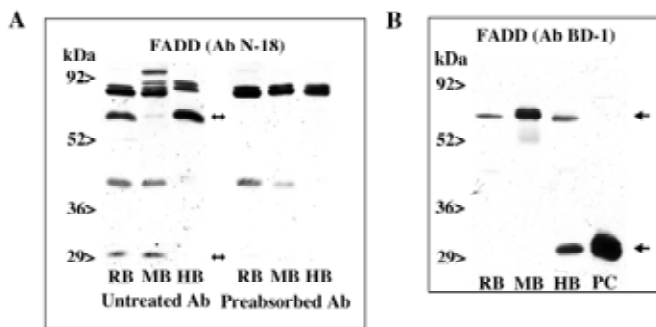


Figura 10 A. “Inmunoblot” representativo de la proteína FADD (~25-30 y 51-75 kDa) con el anticuerpo anti-FADD N-18 en cerebro de rata (RB, corteza cerebral), de ratón (MB, corteza cerebral), y en cerebro humano (HB, corteza prefrontal). La especificidad del anticuerpo FADD N-18 se testó inactivando el anticuerpo con su péptido antigénico (anticuerpo preabsorbido), lo que conllevó al bloqueo de la inmunodensidad de la proteína FADD (formas monoméricas y diméricas).

B. “Inmunoblot” representativo de la proteína FADD (~25-30 y 51-75 kDa) con el anticuerpo monoclonal anti-FADD (Ab BD-1) en cerebro de rata (RB, corteza cerebral), de ratón (MB, corteza cerebral), y en cerebro humano (HB, corteza prefrontal). La forma monomérica sólo se reconoce en tejido cerebral humano (flecha, control positivo, PC). En cerebro de rata y ratón la proteína se expresa en forma de dímero. Se cargaron 40 µg de proteína para cada muestra.

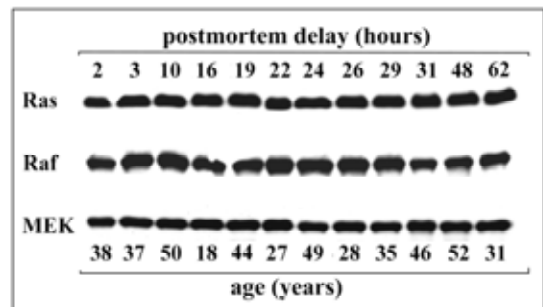
Como se observó en otros trabajos *in vitro* con líneas celulares (Gómez-Angelats y Cidlowski, 2003), la proteína FADD se localizó en tejido cerebral en la membrana plasmática, así como en el citoplasma y en el compartimiento nuclear (véase figura 9 C).

A la luz de estos experimentos preliminares, se decidió inmunodetectar y cuantificar los efectos de los fármacos opiáceos sobre la forma de 51 kDa de FADD (homodímeros) con el anticuerpo H-181 en homogenados totales de tejido cerebral.

Efecto del retraso autopsico (PMD) y de la edad sobre las inmunodensidades de los componentes de la cascada de señalización de las MAPK en cerebro humano

Se estudió la influencia del PMD (rango de 2-62 h) y de la edad (18-50 años) sobre los componentes de la vía de señalización de las MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK) para determinar el patrón de degradación de estas proteínas y el efecto de la edad en cerebro humano. En la corteza prefrontal de un grupo control compuesto por 12 sujetos sanos las inmunodensidades de Ras, c-Raf-1, y de las formas totales de MEK y ERK no se vieron alteradas ni en función del tiempo de retraso autopsico (2-62 h), ni en función de la edad (18-50 años) (véanse figuras 11 y 12).

Figura 11. Efectos del retraso autopsico (PMD: de 2-62 h) y de la edad (18-50 años) sobre las inmunodensidades de los componentes de la cascada de señalización de las MAPK en cerebro de sujetos control. Se muestran los “inmunoblots” representativos (40 µg de proteína) para tres de las proteínas clave de la vía: Ras, Raf y MEK.



Sin embargo, en los mismos cerebros, las inmunodensidades de las formas fosforiladas de MEK (p⁺Ser 217/221) y ERK1/2 (p⁺Tyr 204), formas activas de estos enzimas, se redujeron de forma marcada a partir de un PMD de 30 h (véase figura 12 para ERK1/2).

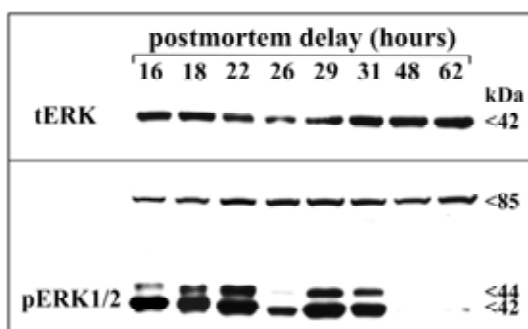


Figura 12. “Inmunoblots” representativos del efecto del PMD (16-62 h) sobre la inmunoreactividad de tERK y de pERK1/2 (p44/42) en la corteza prefrontal humana (8 sujetos sanos). Se cargaron 40 µg de proteína por sujeto en un mismo gel. Nótese que PMD superiores a 31 h se asociaron con marcadas reducciones (>90%) en el contenido de pERK1/2 pero no en el de tERK. El anticuerpo anti-pERK (Calbiochem) también inmunodetectó un péptido no identificado a 85 kDa que no se vio afectado por el PMD (control interno).

(Tomado del Artículo V, Ferrer-Alcón *et al.*, 2004)

Por esta razón, en posteriores estudios, los componentes de la cascada de señalización de las MAPK se cuantificaron en un subgrupo de sujetos adictos a opiáceos (PMD: 21 ± 2 h; edad: 32 ± 3 años, n=12) emparejados con los sujetos control apropiados (PMD: 23 ± 3 h; edad: 34 ± 4 años, n=12).

Efecto del retraso autopsico (PMD) sobre las inmunodensidades de las proteínas de la vía apoptótica iniciada a través del complejo Fas/FADD en cerebro humano

Se estudió la influencia del PMD (rango de 5-102 h) sobre las inmunodensidades de los componentes de la cascada de señalización apoptótica mediada a través del complejo Fas/FADD para determinar el patrón de degradación de estas proteínas en cerebro humano. En la corteza prefrontal de un grupo control compuesto por 13 sujetos sanos las inmunodensidades de FADD, caspasa-8 y caspasa-3, pero no las de Fas (forma glicosilada y agregados) ni β -actina, se redujeron en función del tiempo de retraso autopsico (5-102 h) (véase figura 13).

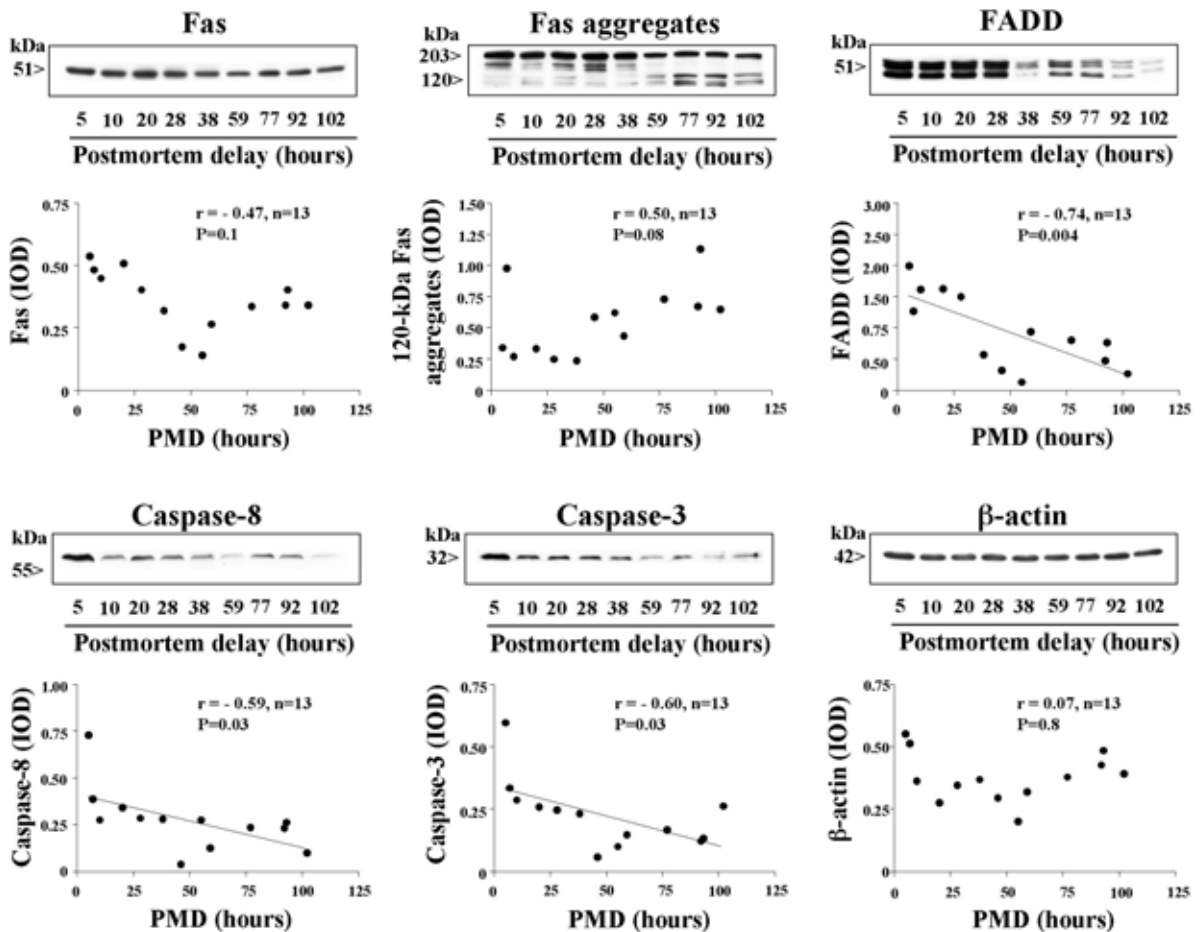


Figura 13. Efecto del retraso autopsico (PMD: de 5 a 102 h) sobre las inmunodensidades de las proteínas de la vía apoptótica (receptor Fas glicosilado y formas agregadas de 203 y 120 kDa; proteína de acople FADD; caspasa-8 y caspasa-3) y sobre la inmunodensidad de β -actina en cerebro humano (13 sujetos sanos: 9 hombres, 4 mujeres; edad: 15-52 años; todos los sujetos procesados en el mismo gel). Se muestran los “inmunoblots” representativos (40 μ g de proteína) del receptor Fas (51 kDa) y sus formas agregadas (203 y 120 kDa), y de las proteínas FADD (51 kDa), caspasa-8 (55 kDa), caspasa-3 (32 kDa) y β -actina (42 kDa) en muestras de corteza prefrontal (área 9 de Brodmann) de sólo 9 sujetos. Los experimentos se repitieron dos veces obteniéndose resultados similares. La influencia del PMD sobre las proteínas diana se estudió

mediante un análisis de correlación, donde los valores de r son los coeficientes de Pearson y las líneas representan las regresiones de las correlaciones. Los ejes verticales (inmunodensidades) se expresan como unidades de densidad óptica integrada (IOD).

Por esta razón, en los estudios posteriores con estas proteínas, los controles y los adictos también se emparejaron teniendo en cuenta esta variable (PMD).

Cuantificación fotodensitométrica

Cuantificación de Fas (48 kDa), Bcl-2, y NF-L en cerebro de rata: las películas fotográficas se digitalizaron en un analizador de imagen Bio-Image (Millipore, Ann Arbor, Michigan, USA). Las bandas se cuantificaron utilizando el modo transmitancia con una resolución de 84 μm , obteniendo así los valores de densidad óptica integrada (DOI) para cada una de las muestras. Con este sistema de análisis de imagen, cada banda es dividida en al menos 2,000 áreas y el valor de DOI resulta de la suma de la absorbancia de cada una de ellas.

Para la cuantificación de las proteínas diana, las muestras problema fueron evaluadas utilizando rectas patrón (proteínas totales cargadas frente a DOI) consistentes en al menos 4 puntos con diferente contenido proteico (entre 25-125 μg). De esta manera se comprobó la relación lineal existente entre la cantidad de proteína cargada y los valores de DOI, para todo el intervalo de concentración de proteína utilizada. Las rectas patrón se construyeron utilizando el programa GraphPAD (Motulsky y Ransnas, 1987). Para las proteínas de estudio se encontraron relaciones lineales entre la cantidad de proteína cargada en el gel y la DOI, con coeficientes de correlación cercanos a 1, para todo el rango proteico testado. De esta forma, en un mismo gel se cargaron muestras control (ratas tratadas con vehículo), muestras de ratas tratadas con los fármacos en estudio, y una recta patrón.

Para cada muestra, la cantidad de proteína teórica cargada en el gel (Pt) se obtuvo de la interpolación del valor de DOI de esta muestra problema en la recta patrón. El porcentaje de cambio de la proteína diana, de una muestra dada respecto a la muestra control (tratada con vehículo), se calculó con la relación $(\text{Pt}/\text{Pr}) \times 100$; donde Pr era la cantidad real de proteína cargada en el gel. Este procedimiento de cuantificación se repitió al menos cinco veces para cada muestra de cerebro de rata en geles diferentes, y se calculó el valor medio. La media de los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron entre 7-10% y 18-20%, respectivamente, para las diferentes proteínas diana.

Cuantificación de Fas (nativo y glicosilado) y de dinamina en cerebro de rata: las películas fotográficas se digitalizaron y cuantificaron en un analizador de imagen GS-700 (resolución de 42 μm) (BioRad, Hercules, CA, USA) obteniéndose las DOI de las proteínas específicas. En el mismo gel, se compararon, a igual cantidad de proteína cargada, las DOI de las proteínas diana para ratas tratadas con opiáceos u otros fármacos, frente a las DOI de las ratas control que recibieron el vehículo (solución salina o DMSO). Antes de realizar el análisis, se comprobó la linealidad en la concentración de proteína para la técnica empleada mediante la resolución de concentraciones de proteína seleccionadas (proteína total cargada frente a unidades de DOI). Se cargaron cinco puntos con diferente cantidad de proteína, normalmente de 10 a 80 μg , que proporcionaron buenas relaciones lineales para las proteínas de estudio.

En las series experimentales se cargaron 40 μg de proteína, cantidad englobada dentro del rango lineal apropiado para inmunodetectar las proteínas de interés. El procedimiento de cuantificación se realizó de 2 a 4 veces en geles diferentes, cada uno de ellos con distintas muestras cerebrales de ratas vehículo (salino/DMSO) y de ratas tratadas con el fármaco. Finalmente, se calcularon los cambios en porcentaje de la inmunoreactividad de cada rata tratada con el fármaco específico, respecto a la de la media de las muestras control en cada gel (100%). El valor medio obtenido para cada animal en los distintos geles, sirvió para calcular la media global de todo el grupo experimental (animales sometidos al mismo tratamiento), siendo ésta una estimación final del efecto del tratamiento sobre la proteína de estudio.

Para la cuantificación de las proteínas de estudio en las muestras cerebrales humanas (adictos a opiáceos) así como para las muestras cerebrales de ratones (con y sin deficiencias genéticas) el procedimiento que se siguió fue el mismo que se acaba de describir.

Como se ha comentado en la Introducción, los fármacos opiáceos inducen alteraciones en el contenido de las proteínas del citoesqueleto: neurofilamentos (García-Sevilla *et al.*, 1997; Ferrer-Alcón *et al.*, 2003) y dinamina (Noble *et al.*, 2000). Por este motivo, en uno de los estudios de esta Tesis doctoral (véase Artículo II) no se utilizó una proteína específica del citoesqueleto como control negativo del experimento. Sin embargo, al realizar la cuantificación de las proteínas de interés, en los autorradiogramas se apreciaron otros péptidos (no identificados) que no estaban relacionados con estas proteínas. Para valorar la bondad de cada experimento realizado y como un control de carga entre carriles

se cuantificaron estos péptidos inespecíficos. En otras series experimentales se utilizó la β -actina como un control de la bondad experimental (control de carga) (véase Artículo IV). Esta proteína del citoesqueleto es una de las pocas que no se ve alterada por la acción de los fármacos opiáceos (Ammon *et al.*, 2003; Marie-Claire *et al.*, 2004).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism (versión 3.0). Los resultados se expresaron como la media de los valores obtenidos para cada animal (media) \pm el error estándar de la media (ESM). Para las evaluaciones estadísticas de los resultados, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre distintos grupos de tratamientos farmacológicos, seguido del test de Scheffé o de Bonferroni para realizar comparaciones múltiples entre los diferentes grupos experimentales. En otros bloques experimentales se utilizó el test t de Student cuando sólo se comparaban dos grupos experimentales. Para evaluar las muestras de adictos a opiáceos se utilizó el test-t para una única muestra (“one-sample t-test”) que se comparó con el grupo control (100%). La correlación lineal entre parámetros cuantitativos se expresó mediante el coeficiente r de Pearson. Para todos los experimentos, el nivel de significancia estadística escogido fue de $p \leq 0.05$.

IV. RESULTADOS

ARTÍCULO I

ARTÍCULO I

Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain.

M. Assumpció Boronat, M. Julia García-Fuster, Jesús A. García-Sevilla.

British Journal of Pharmacology 134: 1263-1270 (2001).

Este estudio piloto puso de manifiesto que la administración crónica de morfina (protocolos para inducción de tolerancia y dependencia, o sólo tolerancia), se asoció con incrementos en la densidad de la proteína pro-apoptótica Fas (forma glicosilada de 48 kDa) (vía extrínseca) y decrementos de la oncoproteína anti-apoptótica Bcl-2 (vía intrínseca), así como con disminuciones de la tasa basal de neurofilamento NF-L en cerebro de rata. Estos efectos fueron antagonizados con la administración paralela de naloxona (antagonista no específico de los receptores μ , δ y κ), lo que indicó una involucración directa de los receptores opioides. Estos resultados pusieron de manifiesto que la inducción de tolerancia y dependencia a opiáceos es capaz de modular proteínas reguladoras de la apoptosis en cerebro de mamíferos.

Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain

¹M. Assumpció Boronat, ¹M. Julia García-Fuster & ^{*,1,2}Jesús A. García-Sevilla

¹Laboratory of Neuropharmacology, Associate Unit of the Institute Cajal/CSIC, Department of Biology, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa Km 7.5, E-07071 Palma de Mallorca, Spain and ²Clinical Research Unit, Department of Psychiatry, University of Geneva, HUG Belle-Idée, 2 Chemin du Petit-Bel-Air, CH-1225 Chêne-Bourg, Switzerland

1 This study was designed to assess the influence of activation and blockade of the endogenous opioid system in the brain on two key proteins involved in the regulation of programmed cell death: the pro-apoptotic Fas receptor and the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein.

2 The acute treatment of rats with the μ -opioid receptor agonist morphine (3–30 mg kg⁻¹, i.p., 2 h) did not modify the immunodensity of Fas or Bcl-2 proteins in the cerebral cortex. Similarly, the acute treatment with low and high doses of the antagonist naloxone (1 and 100 mg kg⁻¹, i.p., 2 h) did not alter Fas or Bcl-2 protein expression in brain cortex. These results discounted a tonic regulation through opioid receptors on Fas and Bcl-2 proteins in rat brain.

3 Chronic morphine (10–100 mg kg⁻¹, 5 days, and 10 mg kg⁻¹, 13 days) induced marked increases (47–123%) in the immunodensity of Fas receptor in the cerebral cortex. In contrast, chronic morphine (5 and 13 days) decreased the immunodensity of Bcl-2 protein (15–30%) in brain cortex. Chronic naloxone (10 mg kg⁻¹, 13 days) did not alter the immunodensities of Fas and Bcl-2 proteins in the cerebral cortex.

4 The concurrent chronic treatment (13 days) of naloxone (10 mg kg⁻¹) and morphine (10 mg kg⁻¹) completely prevented the morphine-induced increase in Fas receptor and decrease in Bcl-2 protein immunoreactivities in the cerebral cortex.

5 The results indicate that morphine, through the sustained activation of opioid receptors, can promote abnormal programmed cell death by enhancing the expression of pro-apoptotic Fas receptor protein and damping the expression of anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein.

British Journal of Pharmacology (2001) **134**, 1263–1270

Keywords: Morphine; naloxone; opioid receptors; opioid addiction; apoptosis; Fas receptor; Bcl-2 oncoprotein; rat brain

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; DAMGO, D-ALA², Mephe⁴, Gly-OH⁵-enkephalin; IOD, integrated optical density; MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MPP⁺, 1-methyl-4-phenylpyridinium; NF, neurofilament; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

Introduction

Apoptosis, or programmed cell death, is an active process of normal cell death during development and also occurs as a consequence of the cytotoxic effect of various neurotoxins (e.g., MPTP/MPP⁺, MDMA, ethanol and cocaine) (Sastry & Rao, 2000). Among the drugs of abuse, cocaine has been shown to cause a direct cytotoxic effect on the foetal rat heart, and to induce apoptosis in foetal rat myocardial cells in a dose-dependent manner (Xiao *et al.*, 2000). The induction of apoptosis in neurones has been demonstrated to share the same basic mechanisms with all other cell types (Sastry & Rao, 2000; Yuan & Yankner, 2000). Recent *in vitro* studies also indicate that exposure to μ - and/or κ -opioid receptor agonists of neuronal cultures from embryonic chick brain (Goswami *et al.*, 1998) and specific cell lines (Dawson *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997; Singhal *et al.*, 1998; 1999)

increases their vulnerability to death by apoptotic mechanisms.

The molecular mechanisms of apoptosis (i.e., the detailed cascade of events from the cell surface to final changes in the nucleus) have not been established yet, but various key proteins are involved in the regulation of programmed cell death (Kinloch *et al.*, 1999; Sastry & Rao, 2000). Thus, some members of the Bcl-2 family of proteins, such as Bcl-2 and Bcl-x_L, suppresses apoptosis, while the expression of other, such as the homologues Bax and Bak, are pro-apoptotic (Adams & Cory, 1998). Specifically, the Bcl-2 oncoprotein, localized mainly to the mitochondrial membranes, has been shown to play an important role in protecting neurones from apoptotic cell death (Hockenbery *et al.*, 1990), probably by preventing the release of cytochrome *c* (induced by Bax) and the subsequent activation of specific proteases termed caspases, the proteolytic enzymes which are crucial for the execution of nuclear fragmentation and apoptosis (see Adams & Cory, 1998; Sastry & Rao, 2000; Yuan & Yankner, 2000). In fact, Bax mRNA and Bax protein are increased in the

*Author for correspondence at: Unité de Recherche Clinique, Département de Psychiatrie, HUG Belle-Idée (Le Salève), 2 Chemin du Petit-Bel-Air, CH-1225 Chêne-Bourg/Genève, Switzerland; E-mail: Jesus.A.Garcia-Sevilla@hcuge.ch

substantia nigra of MPTP-treated mice (degeneration of dopamine neurones by apoptosis) (Hassouna *et al.*, 1996), and the release of cytochrome *c* from the mitochondria and the subsequent activation of caspases-3/9 was shown to play a key role in cocaine-induced apoptosis in foetal rat myocardial cells (Xiao *et al.*, 2000). Another key element involved in the regulation of apoptosis is the Fas glycoprotein (also known as CD95 or Apo1), a cell surface receptor that belongs to the tumour necrosis factor receptor family (death receptors) and that is expressed abundantly in various tissues (Nagata & Golstein, 1995; Nagata, 1999; Orlinick *et al.*, 1999). In contrast to Bcl-2 mitochondrial protein, the Fas receptor triggers cell apoptosis when it binds to its ligand FasL, and Fas-mediated death bypasses the usual long sequence of signalling enzymes and immediately activates a pre-existing caspase cascade (Nagata, 1999; Krammer, 2000). In the context of the induction of aberrant apoptosis in opioid addiction, it was of great interest the recent *in vitro* study demonstrating the ability of morphine to increase, through a naloxone-sensitive mechanism, the expression (mRNA) of the pro-apoptotic receptor Fas in mouse splenocytes and in human blood lymphocytes (Yin *et al.*, 1999). A relevant consequence of the morphine-induced potentiation of apoptosis in lymphocytes (Singhal *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 1999) is the reduction of the immune response (and the increase in recurrent infections) observed in heroin addicts (Govitrapong *et al.*, 1998).

Against this background, and because various chronic effects of morphine on the structure of neurones have been interpreted to indicate that opiate drugs might induce neuronal damage after long-term exposure (see Nestler, 1996; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000), the present study was designed to assess the *in vivo* influence of the activation and blockade of the endogenous opioid system (i.e. the acute and chronic effects of the agonist morphine and the antagonist naloxone) on the immunodensities of the pro-apoptotic Fas receptor and the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in the rat brain.

Methods

Animals and treatments

Male Sprague-Dawley rats (250–300 g) were used. The animals received a standard diet with water freely available and were housed under controlled environmental conditions ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% humidity and 12 h light/dark cycle). For the acute treatments, the rats received a single intraperitoneal (i.p.) injection of morphine (3 and 30 mg kg⁻¹) or naloxone (1 and 100 mg kg⁻¹). For the chronic treatment with morphine, the rats were injected i.p. three times (at 08:00, 14:00 and 20:00 h) during 5 consecutive days with increasing doses of the opiate as follows: day 1: 10, 10 and 10 mg kg⁻¹; day 2: 10, 20 and 20 mg kg⁻¹; day 3: 20, 20 and 40 mg kg⁻¹; day 4: 40, 40 and 80 mg kg⁻¹; day 5: 80 and 100 mg kg⁻¹. In another series of chronic experiments, the animals were injected i.p. every 12 h with morphine (10 mg kg⁻¹) during 13 days. In rats, the 5-day treatment with morphine resulted in a high degree of tolerance and dependence (Ulibarri *et al.*, 1987; Escribá *et al.*, 1994) and the 13-day treatment in a marked degree of tolerance (Boronat *et al.*, 1998). For the

chronic treatment with naloxone (10 mg kg⁻¹), the animals received the opiate antagonist i.p. every 12 h during 13 days. In a parallel experiment, a group of rats received i.p. every 12 h and during 13 days an injection of naloxone (10 mg kg⁻¹) followed by a morphine injection (10 mg kg⁻¹) 30 min later. In all series of experiments, control rats received 0.9% saline vehicle i.p. at the indicated treatment times. The animals were killed by decapitation 2 h after the last dose in the acute and in the 5-day chronic morphine treatments, and 24 h after the last injection in the 13-day chronic treatments (morphine and naloxone). The brains were rapidly removed and the parieto-occipital cortex dissected on ice and stored at -70°C until assay. These experiments in rats were performed according to the guidelines of the University of Balearic Islands.

Immunoblotting of Fas, Bcl-2 and 68 kDa neurofilament (NF-L) proteins

For the immunodetection of the target proteins 250–350 mg of cerebral cortex was homogenized (30 s) with an Ultraturrax homogenizer in 5 volumes of 10 mM Tris HCl buffer, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 0.03% Nonidet P-40 (NP-40), and the following protease inhibitors: 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), 5 mM iodoacetamide, 10 µg ml⁻¹ of trypsin-chymotrypsin inhibitor and 1 µg ml⁻¹ of each leupeptin and aprotinin. The samples were then sonicated (10 s) and centrifuged at 4°C and 14,900 × *g* for 15 min. The supernatant was recovered and the protein content determined by the method of Lowry *et al.* (1951) with bovine serum albumin as the standard. An aliquot (400 µl) of the supernatant was mixed with 50 µl of 160 mM Tris HCl, 8% SDS, pH 6.8, and 50 µl of electrophoresis loading buffer (500 mM Tris HCl, 8% SDS, 30% glycerol, 20% 2-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue, pH 6.8) and boiled. The samples were then submitted to SDS-PAGE in a 12% Laemmli gel (1.5 mm thickness). Proteins were transferred to 0.45 micron (for Fas immunoblotting) or 0.2 micron (for Bcl-2 immunoblotting) nitrocellulose membranes and blocked at room temperature for 1 h with phosphate buffered saline solution (PBS in mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 12, KH₂PO₄ 1.38, pH 7.4) containing 5% nonfat dry milk, 0.5% bovine serum albumin and 0.2% Tween 20 (blocking solution). Then, the membranes were incubated overnight at 4°C in blocking solution containing the primary antibody: anti-Fas (M-20; batch D 219) dilution of 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.) and anti-Bcl-2 (ΔC 21; batch C 309) dilution of 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology). The secondary antibody, horseradish peroxidase-linked donkey anti-rabbit immunoglobulin G (IgG), was incubated at 1:5000 dilution in blocking solution at room temperature for 2 h. Immunoreactivity of Fas protein was detected with the Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blot Detection system (Amersham International, U.K.) followed by exposure to Hyperfilm ECL film (Amersham). For Bcl-2 detection the more sensitive ECL-Plus System was used (Amersham).

Fas and Bcl-2 antibodies are rabbit affinity-purified polyclonal antisera raised against a peptide of Fas carboxy terminus (mouse origin) or against a recombinant protein corresponding to amino acids 1–205 of Bcl-2 (human origin). In rat brain, these antisera labelled proteins with relative

molecular masses of $\approx 48/49$ kDa (Fas) and $\approx 25/26$ kDa (Bcl-2) (see Figure 1), which were in good agreement with previous findings in rat tissues (Prehn *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1999). In order to test the selectivity of anti-Fas antibody with specific proteins, the antigenic peptide was used in excess to block the binding of the antibody to the specific protein species tested. Thus, previous preincubation of the antibody with the antigenic peptide (preabsorbed antibody) resulted in the blockade of the immunoreaction for the specific protein (Fas, 48/49 kDa) and other unknown related peptides (≈ 35 –40 kDa) (Figure 1A). In the case of Bcl-2, because of the lack of the antigenic peptide availability, omission of the primary antibody was used as a negative control; i.e. the immunoreactivity was absent under this condition (Figure 1B).

Immunodetection of 68 kDa neurofilament (NF-L) protein, a specific neuronal cytoskeletal protein used as a positive control for the cellular effects of morphine (Boronat *et al.*, 1998; Jaquet *et al.*, 2001) was performed by stripping and reprobing the same nitrocellulose membranes that had been used for the immunodetection of Fas and Bcl-2 proteins.

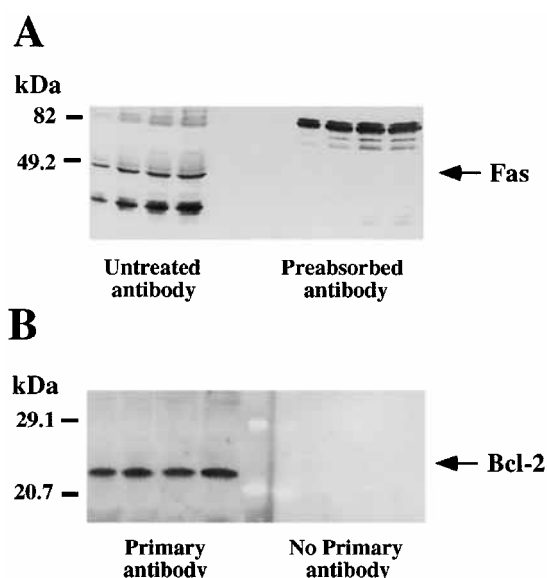


Figure 1 Representative autoradiographs of Western blots depicting labelling of immunodetectable pro-apoptotic Fas receptor (A) and anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein (B) in rat brain membranes. Samples from the cerebral cortex were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (immunoblotting), incubated with the specific primary and secondary antibodies, and visualized by the Enhanced Chemiluminescence (ECL or ECL-Plus) method. The apparent molecular masses of Fas (48/49 kDa) and Bcl-2 (25/26 kDa) proteins were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left hand side. For Fas the amounts of total protein loaded per gel well were: 31.4; 62.7; 94.1; 125.4 (μg) and the corresponding IOD: 0.37; 0.75; 1.08; 1.21 (arbitrary units) (standard curve; μg protein vs IOD, $r=0.98$). For Bcl-2 the amounts of total protein loaded per gel well were: 31.4; 62.7; 94.1; 125.4 (μg) and the corresponding IOD: 0.56; 1.29; 2.48; 2.90 (arbitrary units) (standard curve; μg protein vs IOD, $r=0.99$). (A) The specificity of the antibody anti-Fas was assessed by preincubating the antibody with the antigenic peptide (preabsorbed antibody), which resulted in the blockade of the immunoreaction for the specific protein (48/49 kDa) and other unknown related peptides (≈ 35 –40 kDa). (B) For Bcl-2 immunodetection, omission of the primary antibody was used as a negative control and the immunoreactivity was absent under this condition.

Briefly, the membranes were washed three times for 10 min with PBS and then incubated in stripping buffer (2-mercaptoethanol 100 mM, SDS 2%, Tris HCl 62.5 mM, pH 6.8) at 50°C for 30 min with occasional agitation. After two quick rinses with PBS and a further three 10 min washings, the membranes were blocked at room temperature for 1 h with blocking solution and the immunodetection of NF-L protein was performed similarly as described above using a specific monoclonal anti-68 kDa NF-L (Amersham) diluted at 1:500 as the primary antibody, followed by a horseradish peroxidase-linked sheep anti-mouse IgG secondary antibody (1:2000 dilution). The immunoreactivity was detected with the ECL system as described above.

Quantitation of specific immunoreactivity for Fas, Bcl-2 and 68 kDa neurofilament (NF-L) proteins

Specific protein immunoreactivity was quantitated by scanning densitometry in the image analyser Bio Image (Millipore, Ann Arbor, MI, U.S.A.). After scanning, standard curves were constructed using samples from saline-treated rats. In these curves, the total protein loaded in at least four wells (25–125 μg) was plotted against the integrated optical density (IOD). For Fas, Bcl-2 and NF-L linear relationships (correlation coefficients: $r=0.98$ – 0.99) between the amount of protein loaded in the gel and the IOD were found all over the range of protein content used (Figure 1). For the quantitation of the immunoreactivity of the target proteins, samples from saline-treated and drug-treated rats were loaded in the same gel as well as the standard curve and, for every sample, a theoretical amount of protein loaded in the gel (Pt) was obtained by intrapolation of its IOD in the standard curve. The percentage of target protein immunoreactivity of a given sample respect to the standard (saline-treated) samples was calculated as $(\text{Pt}/\text{Pr}) \times 100$; where Pr is the real amount of protein loaded in the gel well. This quantitation procedure was repeated at least five times for each rat brain sample in different gels and the mean value calculated. The mean intra- and inter-assay coefficients of variation were 7–10% and 18–20%, respectively, for the different target proteins.

Statistics

Results are expressed as mean \pm s.e. mean values. One-way ANOVA, followed by Scheffé's multiple comparison test, was used for the statistical evaluations. The level of significance was chosen as $P=0.05$.

Materials and drugs

Morphine HCl was from Unión Químico-Farmacéutica S.A.E. (Madrid, Spain) and naloxone HCl was from Endo Laboratories (Garden City, NY, U.S.A.). Polyclonal rabbit antisera against Fas and Bcl-2 proteins were purchased from Santa Cruz Biotechnology (U.S.A.). Anti-68 kDa NF-L mouse monoclonal antibody, horseradish peroxidase-linked donkey anti-rabbit or sheep anti-mouse IgG antibodies, Enhanced Chemiluminescence (ECL) reagents and Hyperfilm ECL film were supplied by Amersham International (U.K.). Other reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (U.S.A.).

Results

Acute effects of morphine and naloxone on Fas, Bcl-2 and NF-L protein immunoreactivity in rat brain

The acute treatment with the μ -opioid receptor agonist morphine (3 and 30 mg kg⁻¹, i.p. for 2 h), compared with saline solution administration, did not modify significantly the immunodensity of Fas or Bcl-2 proteins in the cerebral cortex (Figure 2A,B). Similarly, the acute treatment with low and high doses of naloxone (1 and 100 mg kg⁻¹, i.p. for 2 h), a non-selective opioid receptor antagonist, did not alter significantly the immunoreactive levels of Fas and Bcl-2 in the cerebral cortex (Figure 2C,D). These results indicated the

absence of a tonic regulation induced by endogenous opioid peptides (i.e., endomorphines), through opioid receptors, on Fas and Bcl-2 proteins in rat brain. Furthermore, the acute treatments with morphine or naloxone did not modify significantly the immunoreactivity of NF-L proteins in cerebral cortex (Figure 2) (see Jaquet *et al.*, 2001).

Chronic effects of morphine and naloxone on Fas, Bcl-2 and NF-L protein immunoreactivity in rat brain

Chronic treatment (5 days) with morphine (increasing doses from 10 to 100 mg kg⁻¹), compared with saline solution administration, induced a marked increase in the immunodensity of Fas receptor protein in the cerebral cortex

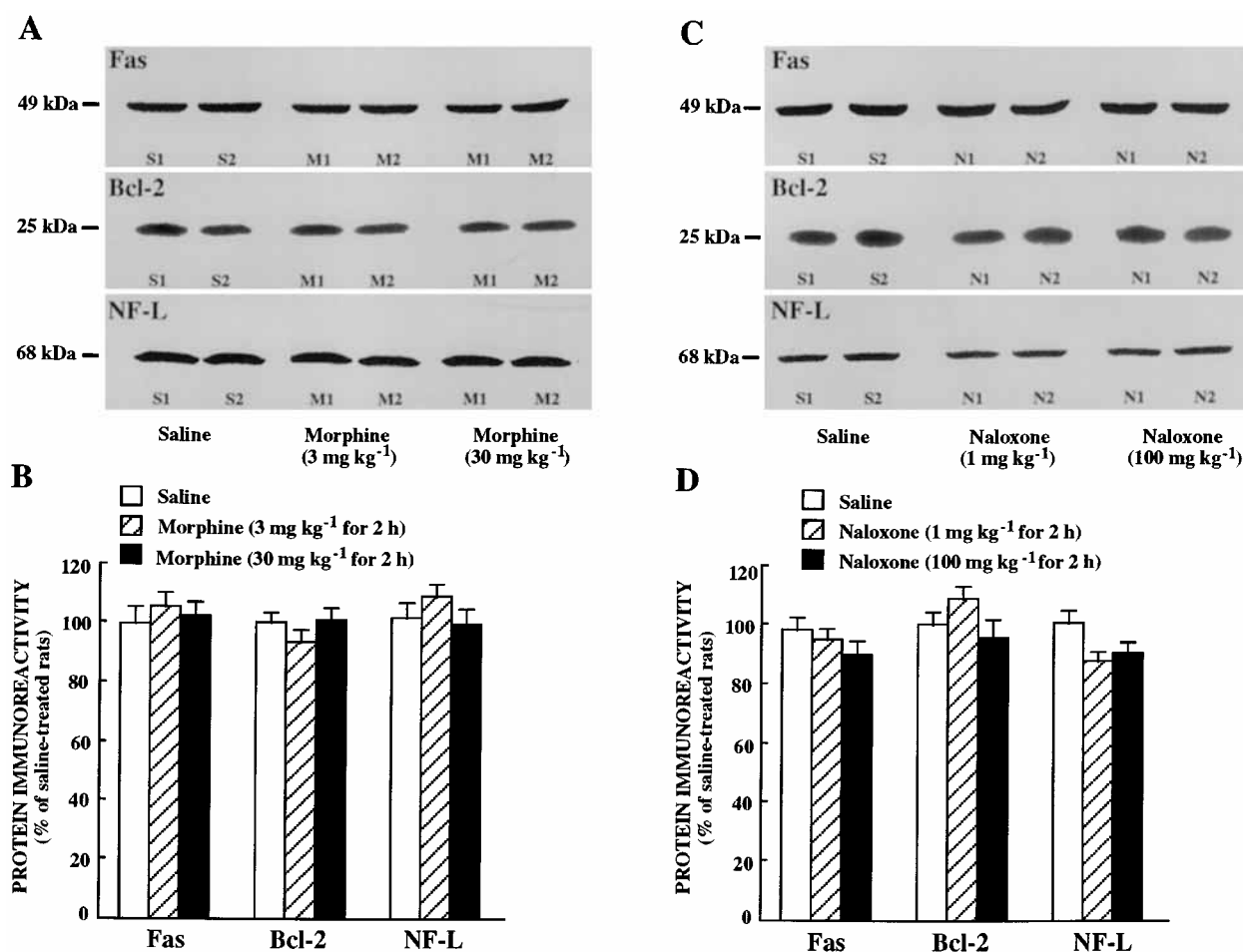


Figure 2 (A) Representative immunoblots using antisera against Fas, Bcl-2 and NF-L proteins in the cerebral cortex of saline-treated rats (two animals, S1 and S2) and morphine-treated rats (3 and 30 mg kg⁻¹, 2 h) (two animals for each acute treatment, M1 and M2). The amount of total protein loaded per gel well ranged from 87 to 89 μ g for the different treatments. Note that the immunodensities of Fas, Bcl-2 and NF-L did not change significantly in morphine-treated rats (IOD, percentage of saline-treated rats, range 95–106%). (B) Columns are means \pm s.e. mean of 6–8 experiments per group performed in duplicate with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA did not detect significant differences for Fas ($F=0.35$, $P=0.71$), Bcl-2 ($F=0.96$, $P=0.39$) and NF-L ($F=1.09$, $P=0.34$) immunodensities after the acute treatments with morphine. (C) Representative immunoblots using antisera against Fas, Bcl-2 and NF-L proteins in the cerebral cortex of saline-treated rats (two animals, S1 and S2) and naloxone-treated rats (1 and 100 mg kg⁻¹, 2 h) (two animals for each acute treatment, N1 and N2). The amount of total protein loaded per well ranged from 88 to 91 μ g for the different treatments. Note that the immunodensities of Fas, Bcl-2 and NF-L did not change significantly in naloxone-treated rats (IOD, percentage of saline-treated rats, range 98–102%). (D) Columns are means \pm s.e. mean of 6–8 experiments per group performed in duplicate with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA did not detect significant differences for Fas ($F=1.04$, $P=0.36$), Bcl-2 ($F=1.58$, $P=0.21$) and NF-L ($F=3.06$, $P=0.05$) immunodensities after the acute treatments with naloxone.

($47 \pm 15\%$, $P < 0.05$) (Figure 3A,B). A prolonged chronic treatment (13 days) with morphine (10 mg kg^{-1} , every 12 h) resulted in a much greater up-regulation in Fas immunoreactivity ($123 \pm 15\%$, $P < 0.001$) in the cortex (Figure 3A,B). In contrast, chronic morphine treatment (13 days) markedly decreased the immunodensity of Bcl-2 protein ($30 \pm 2\%$, $P < 0.001$) (Figure 3A,B). Treatment for 5 days with morphine only showed a tendency to decrease Bcl-2 immunoreactivity in the cerebral cortex ($15 \pm 3\%$, $P > 0.05$) (Figure 3A,B). On the other hand, chronic treatment with naloxone (10 mg kg^{-1} , i.p. for 13 days), compared with saline solution administration, did not modify significantly the immunodensities of Fas, Bcl-2

and NF-L proteins in the cerebral cortex (Figure 3C,D), suggesting further the absence of a tonic regulation of endogenous opioids on these proteins which are involved in the regulation of apoptosis.

To prove further the efficacy of these chronic morphine treatments, the immunodensity of NF-L, a specific neuronal cytoskeletal protein and a neurochemical marker of opioid addiction (Boronat *et al.*, 1998; Jaquet *et al.*, 2001), was also quantitated. Both chronic morphine treatments (5 and 13 days), compared with saline solution administration, induced marked decreases in NF-L immunoreactivity in the cerebral cortex ($42 \pm 3\%$, and $59 \pm 3\%$, respectively, $P < 0.001$) (Figure 3A,B).

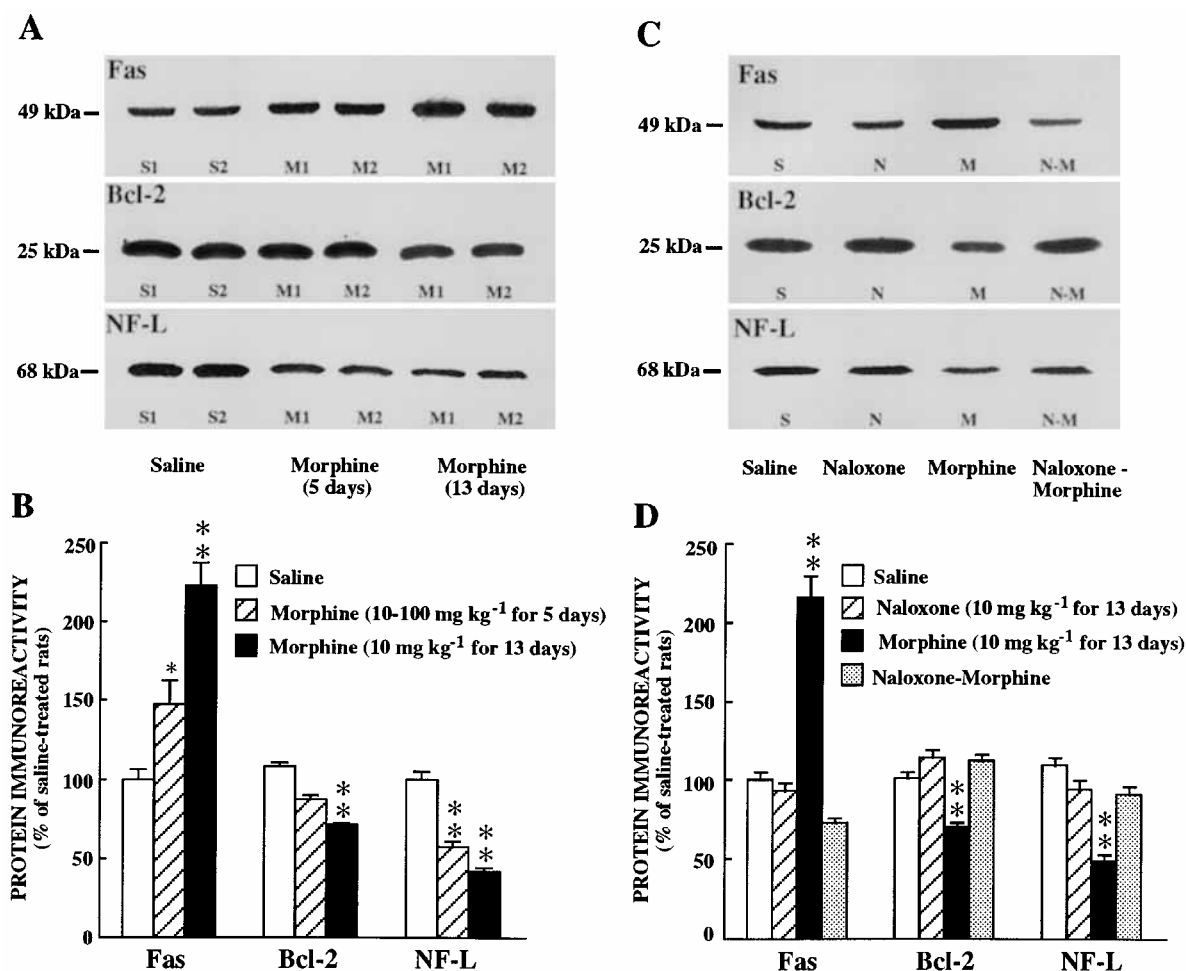


Figure 3 (A). Representative immunoblots using antisera against Fas, Bcl-2 and NF-L proteins in the cerebral cortex of saline-treated rats (two animals, S1 and S2) and chronic morphine-treated rats (10 to 100 mg kg^{-1} for 5 days or 10 mg kg^{-1} every 12 h for 13 days) (two animals for each chronic treatment, M1 and M2). The amount of total protein loaded per gel well ranged from 92 to $96 \mu\text{g}$ for the different treatments. Note that the immunodensity of Fas increased (IOD, percentage of saline-treated rats: 155–238%) and that of Bcl-2 (96–80%) or NF-L (58–45%) decreased in chronic morphine-treated rats. (B) Columns are means \pm s.e. mean of 6–8 experiments per group performed in duplicate with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected significant differences between groups with respect to protein immunodensities after the chronic treatments with morphine: Fas ($F = 27.56$, $P < 0.0001$), Bcl-2 ($F = 51.52$, $P < 0.0001$) and NF-L ($F = 54.81$, $P < 0.0001$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ when compared with the saline group (ANOVA followed by Scheffé's test). (C) Representative immunoblots using antisera against Fas, Bcl-2 and NF-L proteins in the cerebral cortex of saline-treated (S), naloxone-treated (N, 10 mg kg^{-1} for 13 days), morphine-treated (M, 10 mg kg^{-1} for 13 days) and naloxone plus morphine-treated (N–M) rats. The amount of total protein loaded per gel well ranged from 90 to $91 \mu\text{g}$ for the different treatments. Note that naloxone completely prevented the effects of morphine (group N–M) on Fas, Bcl-2 and NF-L immunoreactivity. (D) Columns are means \pm s.e. mean of 6–8 experiments per group performed in duplicate with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected significant differences between groups: Fas ($F = 53.77$, $P < 0.0001$), Bcl-2 ($F = 36.66$, $P < 0.0001$) and NF-L ($F = 25.82$, $P < 0.0001$). ** $P < 0.001$ when compared with the saline group (ANOVA followed by Scheffé's test).

Prevention by naloxone of morphine-induced up-regulation of Fas and down-regulation of Bcl-2 and NF-L protein immunoreactivity in rat brain

The concurrent chronic treatment (13 days) of naloxone (10 mg kg⁻¹, i.p.) and morphine (10 mg kg⁻¹, i.p.), completely prevented the morphine-induced increase in Fas receptor protein immunoreactivity in the cerebral cortex, which even resulted in Fas levels below, but not significantly different, the saline control values (Figure 3C,D). Similarly, the concurrent administration of naloxone and morphine also antagonized completely the morphine-induced decreases in Bcl-2 and NF-L protein immunoreactivities in the cerebral cortex (Figure 3C,D).

Discussion

The main finding of this study is the demonstration that chronic treatment of rats with morphine (tolerant and dependent states) is associated with a remarkable opposite modulation in brain of two key proteins involved in the regulation of the programmed cell death: i.e., a strong up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and a moderate down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein. Moreover, these chronic effects of morphine in the rat brain, which also decreased the abundance of the specific marker of opioid addiction NF-L proteins, were prevented by the concurrent administration of naloxone, an opioid receptor antagonist. At present and because of the time-schedules for the various morphine treatments it cannot completely be discarded an effect of repeated short periods of spontaneous opiate withdrawal on the observed changes on Fas and/or Bcl-2 proteins in brain. However, these *in vivo* findings most probably indicate that the stimulatory and inhibitory effects of chronic morphine on brain pro-apoptotic Fas receptor and anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein, respectively, and on NF-L proteins, are mediated through the sustained activation of opioid receptors and specifically of the μ -type.

Previous *in vitro* studies have demonstrated the ability of morphine and DAMGO, a specific μ -opioid receptor agonist, to induce apoptosis in T lymphocytes and/or Jurkat cells, through mechanisms associated with a decrease in the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and an enhancement in that of pro-apoptotic protein Bax (Singhal *et al.*, 1999). Moreover, morphine has also been shown to increase the expression of pro-apoptotic Fas receptor mRNA in lymphocytes, through the activation of opioid receptors, as well as that in the spleen, lung and heart of mice (Yin *et al.*, 1999). On the other hand, Fas mRNA expression also was shown to be markedly enhanced in splenic lymphocytes of stressed mice (with increased levels of endogenous opioids), an effect that was antagonized by naltrexone or naloxone, which suggested that Fas-mediated lymphocyte apoptosis is dependent on endogenous opioids (Yin *et al.*, 2000). This finding could also imply that in stressed mice there is a tonic regulation of Fas expression mediated by endogenous opioids acting on opioid receptors. In the current study, however, the acute treatment of rats with moderate and high doses of morphine or naloxone did not alter the abundance of immunoreactive Fas receptor or Bcl-2 oncoprotein in brain. Moreover, sustained blockade of opioid receptors with

naloxone (13 days) did not result in significant changes in Fas or Bcl-2 protein expression. These negative results indicated the absence of a tonic regulation induced by endogenous opioid peptides (i.e., endomorphines), through opioid receptors, on Fas and Bcl-2 proteins in rat brain. However, it is also possible that the lack of effects after the acute treatments with morphine could be due to the partial agonist character and/or low efficacy of this prototypical opiate drug (Yu *et al.*, 1997; Kovoov *et al.*, 1998).

During the last few years, various effects of opiate drugs on the structure (cytoskeleton) of neurones have been interpreted to indicate that morphine and other opiates might induce neuronal damage after long-term exposure (see García-Sevilla *et al.*, 1997). Recently, cell-matrix interactions has been suggested to play an important role in apoptosis, specifically in the regulation of anchorage-dependent apoptosis. In fact, cytoskeletal elements (e.g. intermediate filaments and microfilaments) are substrates for both Fas ligand and caspases, and disruption of the cytoskeleton can induce cytotoxicity and apoptotic cell death (Kothakota *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1998; Abbraccio *et al.*, 1999 and other references therein). In this context, chronic treatment with morphine in rats has been shown to result in marked reductions in the immunodensity of NF proteins, the major intermediate filaments of the neuronal cytoskeleton, in brain regions relevant to opioid addiction (Beitner-Johnson *et al.*, 1992; Boronat *et al.*, 1998; Jaquet *et al.*, 2001; present results). Similarly, the immunodensities of nonphosphorylated NF proteins also were shown to be decreased in postmortem brains of chronic heroin abusers (García-Sevilla *et al.*, 1997; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000). Moreover, aberrant hyperphosphorylation of NF-H and NF-M was demonstrated in brains of opioid addicts (Ferrer-Alcón *et al.*, 2000) and in brains of morphine-dependent rats (Jaquet *et al.*, 2001). In opioid-dependent patients, an enlargement of pericortical space and both lateral ventricles was revealed by use of cranial computerized tomography, which indicates volume loss (frontal cortex) of brain (Pezawas *et al.*, 1998). Chronic morphine in rats was also shown to reduce the size and calibre of dendrites and soma of mesolimbic dopamine neurones (Skclair-Tavron *et al.*, 1996), and to decrease the number of dendritic spines on neurones in various brain regions (Robinson & Kolb, 1999), which could be related to the ability of opiate drugs to alter NF proteins (see Ferrer-Alcón *et al.*, 2000). In the neocortex of mice, chronic morphine was shown to reduce the number of calbindin D-28 kDa-positive neurones, a neuroprotective calcium-binding protein (Maharajan *et al.*, 1998), an effect that also might be related to neuronal damage induced by opiate drugs. Recently, chronic administration of morphine or chronic self-administration of heroin has been shown to decrease neurogenesis in the adult rat hippocampus, without altering the normal number of apoptotic cells in this brain region (Eisch *et al.*, 2000). All of this evidence combine to suggest that these structural, morphological and functional changes may reflect some form of neural injury induced by chronic opioid exposure in rats and humans (see Nestler, 1996; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000), and that this neuronal damage might be related, in part, to the ability of opiate drugs to markedly alter cytoskeletal NF proteins (Ferrer-Alcón *et al.*, 2000). In turn, the disruption of the cytoskeleton in

target neurones could induce cytotoxicity and apoptotic cell death (see above).

The current results together with previous findings (Singhal *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 1999) clearly indicate that morphine and other opiate drugs, through the activation of opioid receptors, can promote *in vitro* and *in vivo* abnormal programmed cell death by enhancing the expression of pro-apoptotic Fas receptor (major effect) and damping the expression of anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein (minor effect). Therefore, the induction of aberrant apoptosis in specific types of neurones may be a major consequence of the

neuronal damage induced by opiate drugs after long-term exposure (see Nestler, 1996; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000).

This study was supported by grant BFI2000-0306 (Fondo Nacional para el Desarrollo de la Investigación Científica y Técnica) from MCT (Madrid, Spain), and also in part by grant 32-57066.99 from FNSRS (Bern, Switzerland). M.A. Boronat was supported by a predoctoral fellowship from the University of the Balearic Islands (UIB) and M.J. García-Fuster by a predoctoral research contract from the UIB (Palma de Mallorca, Spain). J. A. García-Sevilla is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Spain).

References

- ABBACCHIO, M.P., ONGINI, E. & MEMO, M. (1999). Disclosing apoptosis in the CNS. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 129–131.
- ADAMS, J.M. & CORY, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322–1326.
- BEITNER-JOHNSON, D., GUITART, X. & NESTLER, E.J. (1992). Neurofilament proteins and the mesolimbic dopamine system: common regulation by chronic morphine and chronic cocaine in the rat ventral tegmental area. *J. Neurosci.*, **12**, 2165–2176.
- BORONAT, M.A., OLMOS, G. & GARCÍA-SEVILLA, J.A. (1998). Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease of neurofilament proteins by idazoxan and other I₂-imidazoline ligands. *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 175–185.
- DAWSON, G., DAWSON, S.A. & GOSWAMI, R. (1997). Chronic exposure to κ -opioids enhances the susceptibility of immortalized neurons (F-11 k7) to apoptosis-inducing drugs by a mechanism that may involve ceramide. *J. Neurochem.*, **68**, 2363–2370.
- EISCH, A.J., BARROT, M., SCHAD, C.A., SELF, D.W. & NESTLER, E.J. (2000). Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 7579–7584.
- ESCRIBÁ, P.V., SASTRE, M. & GARCÍA-SEVILLA, J.A. (1994). Increased density of guanine nucleotide-binding proteins in the postmortem brain of heroin addicts. *Arch. Gen Psychiatry*, **51**, 494–501.
- FERRER-ALCÓN, M., GARCÍA-SEVILLA, J.A., JAQUET, P.E., LA HARPE, R., RIEDERER, B.M., WALZER, C. & GUIMON, J. (2000). Regulation of nonphosphorylated and phosphorylated forms of neurofilament proteins in the prefrontal cortex of human opioid addicts. *J. Neurosci. Res.*, **61**, 338–349.
- GARCÍA-SEVILLA, J.A., VENTAYOL, P., BUSQUETS, X., LA HARPE, R., WALZER, C. & GUIMON, J. (1997). Marked decrease of immunolabelled 68 kDa neurofilament (NF-L) proteins in brains of opiate addicts. *NeuroReport*, **8**, 1561–1570.
- GOSWAMI, R., DAWSON, S.A. & DAWSON, G. (1998). Cyclic AMP protects against staurosporine and wortmannin-induced apoptosis in both embryonic and immortalized (F-11 k7) neurons. *J. Neurochem.*, **70**, 1376–1382.
- GOVITRAPONG, P., SUTTITUM, T., KOTCHABHAKDI, N. & UN-EKLABH, T. (1998). Alterations of immune functions in heroin addicts and heroin withdrawal subjects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 883–889.
- HASSOUNA, I., WICKERT, H., ZIMMERMANN, M. & GILLARDON, F. (1996). Increase in Bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice. *Neurosci. Lett.*, **204**, 85–88.
- HOCKENBERRY, D., NUÑEZ, G., MILLIMAN, C., SCHREIBER, R.D. & KORSMEYER, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, **348**, 334–336.
- JAQUET, P.J., FERRER-ALCÓN, M., VENTAYOL, P., GUIMON, J. & GARCÍA-SEVILLA, J.A. (2001). Acute and chronic effects of morphine and naloxone on the phosphorylation of neurofilament-H proteins in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, **304**, 37–40.
- KINLOCH, R.A., TREHERNE, J.M., FURNESS, L.M. & HAJIMOHA-MADREZA, I. (1999). The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 35–42.
- KOVOOR, A., CELVER, J.P., WU, A. & CHAVKIN, C. (1998). Agonist induced homologous desensitization of μ -opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor kinases is dependent on agonist efficacy. *Mol. Pharmacol.*, **54**, 704–711.
- KOTHAKOTA, S., AZUMA, T., REINHARD, C., KLIPPEL, A., TANG, J., CHU, K., MCGARRY, T.J., KIRSCHNER, M.W., KOTHS, K., KWIATKOWSKI, D.J. & WILLIAMS, L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, **278**, 294–298.
- KRAMMER, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**, 789–795.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- MAHARAJAN, P., PRENCIPE, R., FALCHETTI, R., DI FRANCESCO, P., PAINO, G. & MAHARAJAN, V. (1998). Chronic morphine alters calbindin D-28k immunostaining patterns in mouse forebrain. *Neurosci. Lett.*, **243**, 65–68.
- NAGATA, S. (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.*, **33**, 29–55.
- NAGATA, S. & GOLSTEIN, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, **267**, 1449–1456.
- NESTLER, E.J. (1996). Under siege: the brain on opiates. *Neuron*, **16**, 897–900.
- ORLINICK, J.R., VAISHNAW, A.K. & ELKON, K.B. (1999). Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int. Rev. Immunol.*, **18**, 293–308.
- PEZAWAS, L.M., FISCHER, G., DIAMANT, K., SCHEIDER, C., SCHINDLER, S.D., THURNHER, M., PLOECHL, W., EDER, H. & KASPER, S. (1998). Cerebral CT findings in male opioid-dependent patients: stereological, planimetric and linear measurements. *Psychiatry Res. (Neuroimaging Sect.)*, **83**, 139–147.
- PIKE, B.R., ZHAO, X., NEWCOMB, J.K., POSMANTUR, R.M., WANG, K.K. & HAYES, R.L. (1998). Regional calpain and caspase-3 proteolysis of alpha-spectrin after traumatic brain injury. *NeuroReport*, **9**, 2437–2442.
- PREHN, J.H.M., BINDOKAS, V.P., MARCUCCILLI, C.J., KRAJEWSKI, S., REED, J.C. & MILLER, R.J. (1994). Regulation of neuronal Bcl-2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type β confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 12599–12603.
- ROBINSON, T.E. & KOLB, B. (1999). Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse*, **33**, 160–162.
- SASTRY, P.S. & RAO, K.S. (2000). Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.*, **74**, 1–20.
- SINGHAL, P.C., SHARMA, P., KAPASI, A.A., REDDY, K., FRANKI, N. & GIBBONS, N. (1998). Morphine enhances macrophage apoptosis. *J. Immunol.*, **160**, 1886–1893.
- SINGHAL, P.C., KAPASI, A.A., REDDY, K., FRANKI, N., GIBBONS, N. & DING, G. (1999). Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. *J. Leukoc. Biol.*, **66**, 650–658.
- SKLAIR-TAVRON, L., SHI, W.-X., LANE, S.B., HARRIS, H.W., BUNNEY, B.S. & NESTLER, E.J. (1996). Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 11202–11207.

- TAYLOR, M.F., DE BOER-BROUWER, M., WOOLVERIDGE, I., TEERDS, K.J. & MORRIS, I.D. (1999). Leyding cell apoptosis after the administration of ethane dimethanesulfonate to the adult male rat is a fas-mediated process. *Endocrinology*, **140**, 3797–3804.
- ULIBARRI, I., GARCÍA-SEVILLA, J.A. & UGEDO, L. (1987). Modulation of brain α_2 -adrenoceptors and μ -opioid receptor densities during morphine dependence and spontaneous withdrawal in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **336**, 530–537.
- XIAO, Y., HE, J.H., GILBERT, R.D. & ZHANG, L. (2000). Cocaine induces apoptosis in fetal myocardial cells through a mitochondria-dependent pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 8–14.
- YIN, D.L., REN, X.H., ZHENG, Z.L., PU, L., JIANG, L.Z., MA, L. & PEI, G. (1997). Etorphine inhibits cell growth and induces apoptosis in SK-N-SH cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G proteins. *Neurosci. Res.*, **29**, 121–127.
- YIN, D., MUFSON, R.A., WANG, R. & SHI, Y. (1999). Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature*, **397**, 218.
- YIN, D., TUTHILL, D., MUFSON, R.A. & SHI, Y. (2000). Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J. Exp. Med.*, **191**, 1423–1428.
- YU, Y., ZHANG, L., YIN, X., SUN, H., UHL, G.R. & WANG, J.B. (1997). μ Opioid receptor phosphorylation, desensitization, and ligand efficacy. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28869–28874.
- YUAN, J. & YANKNER, B.A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, **407**, 802–809.

(Received March 26, 2001

Revised July 10, 2001

Accepted September 3, 2001)

ARTÍCULO II

ARTÍCULO II

Modulation of Fas receptor proteins and dynamin during opiate addiction and induction of opiate withdrawal in rat brain.

M. Julia García-Fuster, Marcel Ferrer-Alcón, Antonio Miralles, Jesús A. García-Sevilla.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 368: 421-431(2003).

Esta investigación estuvo encaminada a caracterizar en tejido cerebral (rata, ratón y humano) las formas de expresión del receptor Fas (proteína nativa de 35 kDa, formas glicosiladas de 48 y 51 kDa) y su modulación por fármacos opiáceos típicos y atípicos. Los resultados más relevantes pusieron de manifiesto que el tratamiento crónico con heroína y la retirada del opiáceo (síndrome de abstinencia) se asociaron con incrementos significativos en la densidad de Fas nativo (forma monomérica) y con diferentes regulaciones de las formas glicosiladas del receptor. Los resultados obtenidos con otros fármacos opiáceos (agonistas μ , agonistas δ , agonistas κ , y sus respectivos antagonistas) y ligandos preferentes del receptor σ (pentazocina, opiáceo mixto) pusieron de manifiesto la preponderancia del receptor opioide μ como modulador (activador) del receptor Fas.

ORIGINAL ARTICLE

M. Julia García-Fuster · Marcel Ferrer-Alcón
Antonio Miralles · Jesús A. García-Sevilla

Modulation of Fas receptor proteins and dynamin during opiate addiction and induction of opiate withdrawal in rat brain

Received: 25 April 2003 / Accepted: 19 August 2003 / Published online: 3 October 2003

© Springer-Verlag 2003

Abstract The Fas receptor is involved in the regulation of apoptosis but also can function as a non-apoptotic signal transducer. This study was mainly designed to quantify Fas proteins in rat brain during heroin addiction and opiate withdrawal. In rat, mouse and human brains, and in SH-SY5Y cells, similar forms of Fas were immunodetected with different antibodies (i.e., 35 kDa native Fas and 48- and 51-kDa glycosylated Fas). Acute (2 h) treatments with the μ -opioid receptor agonists heroin (10 mg/kg) and morphine (30 mg/kg) increased the immunodensity of native Fas (124% and 36%) but not that of glycosylated Fas in the cerebral cortex. Chronic (5 days) heroin (5–30 mg/kg) and morphine (10–100 mg/kg) were also associated with increased native Fas (76% and 45%) and with different expressions of glycosylated Fas. In heroin-dependent rats, opiate withdrawal (48 h) resulted in a sustained increase in native Fas (107%) and in up-regulation of 51 kDa glycosylated Fas (51%). Acute treatments with selective δ -receptor (SNC-80, 10 mg/kg) or κ -receptor (U 50488-H, 10 mg/kg) agonists did not alter the content of native or glycosylated Fas. Chronic pentazocine (10–80 mg/kg, 5 days), a mixed opiate drug and σ_1 receptor agonist, decreased native (48%) and glycosylated (38–82%) Fas proteins. Similarly, the selective σ_1 agonist (+)-SKF 10047 also decreased native Fas (37%) and the effect was blocked by the σ_1 antagonist BD 1063. Brain dynamin was up-regulated by acute and/or chronic heroin (30–39%), morphine (47–85%), pentazocine (51%) and heroin with-

drawal (74%). The main results indicate that chronic heroin/morphine treatment and heroin withdrawal are associated with up-regulation of 35 kDa native Fas (and with different expressions of glycosylated Fas), and also with concomitant increases of dynamin in rat brain.

Keywords Fas receptor proteins · Dynamin · Opiate drugs · σ Ligands · Naloxone · Opiate addiction · Opiate withdrawal · Rat brain

Introduction

The Fas/Fas-L and other signaling systems are well-known cellular pathways associated with the physiological regulation of programmed cell death (apoptosis; MacEwan 2002). The Fas receptor (also known as CD95 or APO-1) is a prototype member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor superfamily of death receptors (Itoh et al. 1991; Watanabe-Fukunaga et al. 1992; Nagata and Golstein 1995; Nagata 1999; Orlinick et al. 1999), which is widely expressed in normal tissues (Watanabe-Fukunaga et al. 1992) including the brain (Bechmann et al. 1999; Choi et al. 1999; Boronat et al. 2001). The Fas receptor has an extracellular domain with two putative N-linked glycosylation sites and a cysteine-rich region for ligand binding (Fas-L), and an intracellular death domain near the C-terminal region of the molecule (Watanabe-Fukunaga et al. 1992; Orlinick et al. 1999). Native Fas receptor has a relative molecular mass \approx 35 kDa, but after post-translational modifications mature Fas is mostly expressed as glycosylated proteins of \approx 45–52 kDa (Itoh et al. 1991; Oehm et al. 1992; Watanabe-Fukunaga et al. 1992; Kamitani et al. 1997).

Upon receptor activation by Fas-L, the intracellular death domain of Fas rapidly recruits the adaptor molecule FADD (Fas-associated death domain protein), which is followed by activation of various caspase cascades (caspase-8 proenzyme) and specific effector caspases, such as caspase-3, leading to apoptosis (Nagata 1999; Krammer 2000; MacEwan 2002). The induction of apoptosis in neu-

M. J. García-Fuster · A. Miralles · J. A. García-Sevilla (✉)
Laboratory of Neuropharmacology,
Associate Unit of the Institute of Neurobiology
"Ramón y Cajal" (CSIC), Department of Biology,
University of the Balearic Islands,
Cra. Valldemossa Km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain
Fax: +41-22-3055799,
e-mail: jesus.a.garcia-sevilla@hcuge.ch

M. Ferrer-Alcón · J. A. García-Sevilla
Clinical Research Unit, Department of Psychiatry,
University of Geneva,
HUG Belle-Idée, 2 Chemin du Petit-Bel-Air,
1225 Chêne-Bourg/GE, Switzerland

rons has been demonstrated to share the same basic mechanisms with all other cell types (Sastry and Rao 2000; Yuan and Yankner 2000). Besides the primary role of Fas/Fas-L in apoptosis, increasing evidence also indicates the importance of this system as a non-apoptotic signal transducer (Wajant 2002). Among these non-apoptotic functions, the Fas receptor has been shown to transduce proliferative signals in normal human diploid fibroblasts and T cells (Siegel et al. 2000), to mediate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo (Badorff et al. 2002), to stimulate axonal growth in primary neurons (Desbarats et al. 2003), and Fas-L to facilitate antigen acquisition by dendritic cells in melanomas (Tada et al. 2002). In contrast to Fas-mediated apoptosis events, the apoptosis-unrelated biological effects of Fas are still poorly understood.

In a recent study (Boronat et al. 2001), chronic treatment of rats with morphine was shown to be associated, through a naloxone-sensitive mechanism, with an opposite modulation of two key proteins involved in the regulation of the programmed cell death in the brain: up-regulation of pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein. Similarly, morphine also was shown to increase the expression of Fas receptor mRNA in heart, lung, spleen and lymphocytes of mice as well as in human lymphocytes (Yin et al. 1999). Moreover, Fas mRNA expression was found enhanced in splenic lymphocytes of stressed mice (i.e., with abnormal high contents of endogenous opioids), an effect that was antagonized by naloxone, indicating that Fas-mediated lymphocyte apoptosis is dependent on endogenous opioids (Yin et al. 2000). Recently, Fas overexpression and Fas-mediated lymphocyte apoptosis in stressed mice was found abolished in μ -opioid receptor deficient mice (Wang et al. 2002). Together these findings indicated that morphine, through the activation of μ -opioid receptors, could promote abnormal programmed cell death in specific types of neurons (but see Raoul et al. 2002) and other cells. Alternatively, the modulation of Fas receptor by morphine in the brain could be related to the recent discovery that this system (Fas/Fas-L) can also function as a non-apoptotic signal transducer in various cells including neurons (Wajant 2002; Desbarats et al. 2003).

Because of the potential importance of this topic, the present study was mainly designed to assess the modulation of Fas-related proteins (native and glycosylated Fas) during heroin addiction (acute and chronic effects) and the induction of opiate withdrawal in rat brain. For comparison, the acute effects of other opiate and non-opiate drugs were also quantitated. Moreover, the effects of some opiate drugs (heroin, morphine, pentazocine) on dynamin, a recently discovered target of chronic morphine action (Noble et al. 2000) that plays an essential role in receptor endocytosis, were also investigated. A preliminary report of a portion of this work was given at the XXIV congress of the Spanish Society of Pharmacology (García-Fuster et al. 2002).

Materials and methods

Animals and treatments. Adult male Sprague-Dawley rats (250–300 g) were used. The rats were housed under controlled environmental conditions (22°C, 70% humidity, and 12-h light/dark cycle) with free access to a standard diet and tap water. For the acute drug treatments, the rats received a single intraperitoneal (i.p.) injection of heroin (10 mg/kg), morphine (30 mg/kg), SNC-80 (10 mg/kg, a selective δ -opioid receptor agonist), U 50488H (10 mg/kg, a selective κ -opioid receptor agonist), pentazocine (15 mg/kg, an opiate drug and also a potent σ_1 receptor agonist; see Mei and Pasternak 2001, 2002), (+)-SKF 10047 (5 mg/kg, a selective σ_1 receptor agonist; see Matsuno et al. 1995) and BD 1063 (10 mg/kg, a selective σ_1 receptor antagonist; see McCracken et al. 1999). For the chronic treatment with heroin, the rats were injected i.p. three times daily (at 08:00, 14:00 and 20:00 h) during 5 consecutive days with increasing doses of the opiate as follows: day 1: 5, 10, and 10 mg/kg; day 2: 10, 15, and 15 mg/kg; day 3: 15, 20, and 20 mg/kg; day 4: 20, 25, and 25 mg/kg; day 5: 25 and 30 mg/kg (Ventayol et al. 1997). After this chronic heroin treatment, naloxone (2 mg/kg i.p., 2 h)-precipitated withdrawal or spontaneous (48 h) opiate withdrawal was induced which resulted in various withdrawal reactions (data not shown; Gabilondo and García-Sevilla 1995). In another series of chronic experiments, the animals were similarly injected with morphine (10 to 100 mg/kg) or pentazocine (10 to 80 mg/kg) during 5 days (Ventayol et al. 1997). Other rats were chronically treated with (+)-SKF 10047 (3–10 mg/kg for 3 days). In all series of experiments, control rats received 0.9% saline vehicle or DMSO (in the case of SNC-80) i.p. (1 ml/kg) at the indicated treatment times. The animals were killed by decapitation (48 h) after the last dose in the acute and chronic drug treatments or at the times indicated after heroin withdrawal. The brains were rapidly removed and specimens of the cerebral cortex were dissected on ice and stored at -80°C until assay. This study was approved by the research and ethical review board of the Dirección General de Investigación (MCT, Madrid), and the experiments in rats followed the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85–23, revised 1985) and were performed according to the guidelines of the University of the Balearic Islands.

Brain sample preparations and immunoblotting of Fas-related proteins and dynamin. The preparation of rat brain samples and the immunodetection of target proteins were performed as described previously (Ventayol et al. 1997; Boronat et al. 2001) with some modifications. Briefly, 150–200 mg of cerebral cortex was homogenized (1:20, wt/vol) in cold 40 mM Tris HCl buffer, pH 7.5, containing 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 5 mM NaCl, and the protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM) and leupeptin (40 $\mu\text{g/ml}$). The samples were centrifuged at $40,000 \times g$ for 45 min, and then 200 μl of the resulting supernatant (total Fas and dynamin) was mixed with an equal volume of electrophoresis loading buffer (Ventayol et al. 1997), which was then boiled (denatured) and stored at -20°C until use. Protein concentrations were determined by the method of Bradford (Bradford 1976). In addition to rat brain, mouse (cerebral cortex) and human (prefrontal cortex) brain samples (Ferrer-Alcón et al. 2003) and human SH-SY5Y neuroblastoma cells (a clone from SK-N-SH cells which expresses high densities of μ - and δ -opioid receptors, proportion 4:1; Yu et al. 1986; López and Ferrer 2000) were also used for the immunodetection and characterization of Fas-related proteins with different anti-Fas antibodies (see Fig. 1). For these preliminary experiments, total membranes were prepared similarly as above except that the detergent Triton X-100 was not included in the homogenization buffer and the samples were not centrifuged (total homogenates). In some experiments, rat cortical membranes were incubated in the absence or presence of the enzyme N-glycosidase F (15 units for 3 h at 37°C) (Ozaita et al. 1999) to further ascertain the nature of the various Fas receptor proteins (anti-Fas M-20 antibody). In routine experiments, 40 μg protein of each rat (and mouse or human) brain sample or SH-SY5Y cells (20 μg protein) was subjected to SDS-PAGE on 15-well (6 \times 8-cm gels, 1 mm thickness, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 10% polyacrylamide

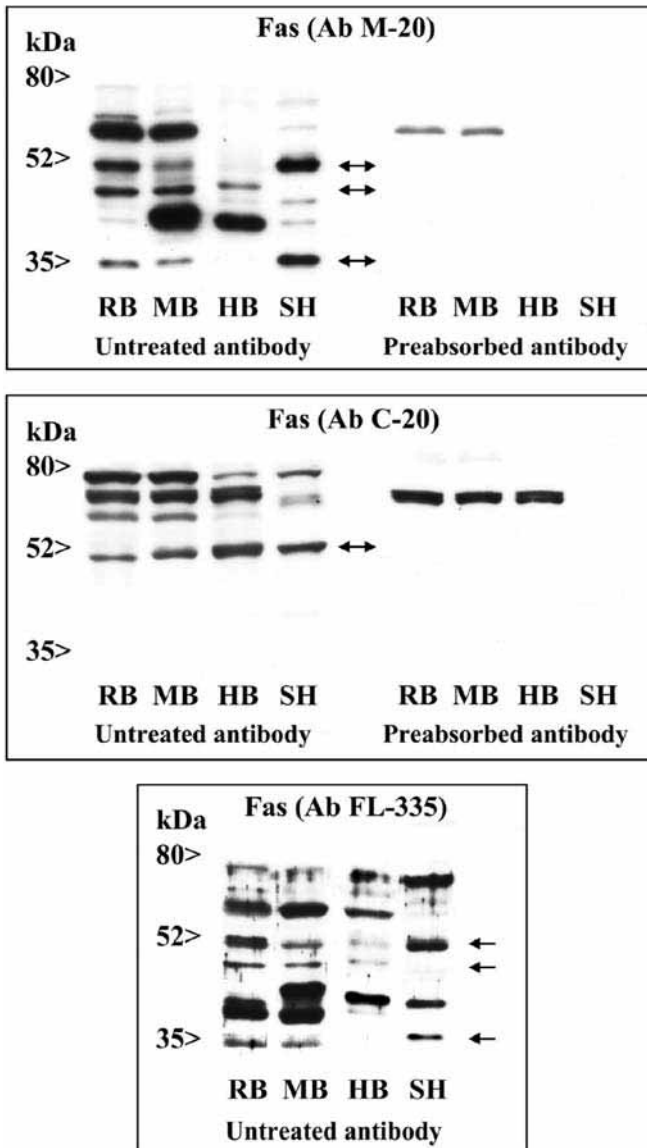


Fig. 1 Representative autoradiographs of Western blots depicting labeling of immunodetectable Fas-related proteins (≈ 35 kDa native Fas and ≈ 48 and 51 kDa glycosylated Fas, *arrows*) with various antibodies (M-20, C-20 and FL-335) in the rat brain (RB, cerebral cortex), mouse brain (MB, cerebral cortex), human brain (HB, prefrontal cortex) and human SH-SY5Y neuroblastoma cells (SH). The samples ($40 \mu\text{g}$ protein for brain tissue and $20 \mu\text{g}$ protein for SH cells) were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (immunoblotting), incubated with the specific primary and secondary antibodies, and visualized by the Enhanced Chemiluminescence method. The specificity of the antibodies anti-Fas M-20 and C-20 were assessed by preincubating the corresponding antibody with its antigenic peptide (preabsorbed antibody), which resulted in the blockade of the immunoreaction for the specific proteins (*double arrows*). The apparent molecular masses of Fas-related proteins were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left hand side. For a given antibody all samples were run in the same gel

minigels. Proteins were electrophoretically transferred (110 V for 2–3 h) to nitrocellulose membranes (western blotting) that were incubated for 1 h in a phosphate-buffered saline containing 5% non-fat dry milk, 0.2% Tween 20 and 0.5% bovine serum albumin

(blocking solution) (Harlow and Lane 1999). Then, the membranes were incubated overnight at 4°C in blocking solution containing the appropriate primary antibody: anti-Fas M-20 (rabbit polyclonal antibody raised against a peptide mapping the carboxyl terminus of Fas of mouse origin; dilution 1:2,000; sc-716, batches D219 and F251, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-Fas C-20 (rabbit polyclonal antibody raised against a peptide mapping the carboxyl terminus of Fas of human origin [amino acids 300–319, cf. Kamitani et al. 1997]; dilution 1:2,000; sc-715, batch D172 Santa Cruz Biotechnology), anti-Fas FL-335 (rabbit polyclonal antibody raised against a recombinant protein corresponding to the full length Fas of human origin; dilution 1:1,000; sc-7886, batch C010 Santa Cruz Biotechnology) or anti-dynamin (mouse monoclonal antibody raised against a peptide mapping the carboxyl terminus of dynamin I of rat origin; dilution 1:2,000; clone 41, batch 4, Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA). The anti-Fas antibodies used do not cross-react with other TNF superfamily transmembrane receptors. In order to test the selectivity of anti-Fas antibodies (M-20 and C-20) with specific proteins, the antigenic peptides (sc-716P and sc-715P, Santa Cruz Biotechnology) were preincubated in excess with the antisera to block the binding of the antibody to the specific protein species tested (Fig. 1). The secondary antibody, horseradish peroxidase-linked anti-rabbit or anti-mouse IgG, was incubated at 1:5,000 dilution in blocking solution at room temperature for 2 h. Immunoreactivity of target proteins was detected with the Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blot Detection system (Amersham International, Buckinghamshire, UK) and visualized by exposure to Hyperfilm ECL film (Amersham) for 30 s to 2 min (autoradiograms).

Quantitation of immunodensities of Fas-related proteins and dynamin. The autoradiograms were quantitated by densitometric scanning (GS-700 Imaging Densitometer, resolution: $42 \mu\text{m}$, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The amount of target proteins (Fas and dynamin) in the cerebral cortex of rats treated with opiate or other drugs was compared in the same gel with that of control rats which received saline or DMSO solution. Prior to analyses, the linearity of protein concentration for Western blotting was ascertained by resolution of selected concentrations of protein (i.e., total protein loaded versus integrated optical density, IOD, units, consisting of 5 points of different protein content, usually 10 to $80 \mu\text{g}$, resulting in good linear relations; data not shown, see Boronat et al. 2001). Experiments were performed by using $40 \mu\text{g}$ protein known to be within the linear range for immunolabeling of Fas-related proteins and dynamin. The quantification procedure was assessed 2–4 times in different gels (each gel with different brain samples from saline/DMSO- and drug-treated rats). Finally, percent changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each rat treated with the specific drug in the various gels and the mean value used as a final estimate. Since opiate drugs induce alterations in the content of cytoskeletal proteins such as neurofilaments (García-Sevilla et al. 1997; Boronat et al. 2001; Ferrer-Alcón et al. 2003), actin (Papakonstanti et al. 1998) and dynamin (Noble et al. 2000), a specific housekeeping cytoskeletal protein was not used as a negative control. Instead, unidentified peptides, not related to Fas, were also quantitated with anti-Fas antibodies (≈ 65 kDa band for M-20 and ≈ 70 kDa band for C-20, see Fig. 1) and the various opiate treatments did not alter significantly the immunodensity of these unknown peptides (e.g., mean \pm SEM IOD values for the unidentified 65 kDa band, saline: 14.4 ± 0.6 , $n=3$; acute heroin: 14.1 ± 0.3 , $n=3$; chronic heroin: 14.0 ± 0.3 , $n=3$; chronic heroin plus naloxone: 14.6 ± 0.4 , $n=3$; chronic pentazocine: 12.8 ± 0.6 , $n=3$).

Data analyses and statistics. All series of data were analyzed with the program GraphPad Prism, version 3.0. Results are expressed as mean \pm SEM values. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test, and Student's two-tailed *t*-test were used for the statistical evaluations. The level of significance was chosen as $p=0.05$.

Drugs and chemicals. Opiate drugs (and their sources) included heroin HCl and morphine HCl (Unión Químico-Farmacéutica S.A.E. (Madrid, Spain), (\pm) pentazocine HCl (Laboratorios Fides, Barce-

lona, Spain), SNC-80 ((+)-4-[(α R)- α -(2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl]-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide) (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK), U-50488-H HCl (1S-trans)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]-benzeneacetamide) (Sigma/RBI, St Louis, Mo, USA) and naloxone HCl (Endo Laboratories, Garden City, NY, USA). (+)-SKF 10047 HCl and BD 1063 HCl (1-[2-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]-4-methylpiperazine) were purchased from Tocris. N-glycosidase F was from Sigma. Acrylamide (Protogel) was from BDH Brunswick (Dorset, UK). Other materials such as the secondary antibodies, ECL reagents and autoradiography films were purchased from Amersham International (UK) or Santa Cruz Biotechnology (USA). All other chemicals were from Sigma Chemical.

Results

Immunodetection of Fas-related proteins in brain tissue and in SH-SY5Y cells

Fas is a widely expressed cell-surface receptor of relative molecular mass ≈ 35 kDa for native Fas and ≈ 45 – 52 kDa for their glycosylated forms (Itoh et al. 1991; Watanabe-Fukunaga et al. 1992). The antibodies used (M-20 and C-20) for the immunodetection of these Fas-related proteins (antisera directed against the cytoplasmic domain of Fas) were first tested for their specificity on Western blots of rat, mouse and human brain membranes as well as in human SH-SY5Y neuroblastoma cell membranes (no detergent added). In rat brain, the antiserum anti-Fas M-20 labeled specific proteins of Mr ≈ 35 kDa (native Fas) and ≈ 48 and 51 kDa (glycosylated Fas) (Fig. 1, top). Thus, previous preincubation of Fas M-20 antibody with the antigenic peptide (preabsorbed antibody) resulted in the blockade of the immunoreaction for the specific proteins (35-, 48- and 51-kDa), but not for other unknown unrelated peptide of higher molecular mass (≈ 65 kDa, Fig. 1, top). Similar results were obtained in mouse and human brains (including two prominent peptides of ≈ 45 kDa probably related to glycosylated Fas) and in SH-SY5Y cells (Fig. 1, top). In rat, mouse and human brain tissues as well as in SH-SY5Y cells, the antiserum anti-Fas C-20 labeled a specific protein of ≈ 51 kDa (glycosylated Fas) which was not immunodetected with the preabsorbed antibody (Fig. 1, middle). In these tissue and cell preparations, anti-Fas C-20 also immunodetected a specific band of ≈ 97 kDa (not shown) which probably represents a processed form of Fas aggregates (≈ 110 – 200 kDa; Kamitani et al. 1997). In rat, mouse and human brains and in SH-SY5Y cells, the pattern of Fas-related proteins immunodetected with the antiserum anti-Fas FL-335 (directed against the full length protein; antigenic peptide not available) was similar to that of anti-Fas M-20, although the immunoblots showed a higher background (Fig. 1, bottom). Therefore, with the use of various antibodies raised to independent epitopes of Fas it was possible to identify the same specific Fas-related proteins in rat brain (i.e., ≈ 35 kDa native Fas and ≈ 48 and 51 kDa glycosylated Fas).

In rat brain membranes extracted with 1% Triton X-100 and probed with anti-Fas M-20, the immunodensity of glycosylated 48 kDa Fas was greatly increased and that of

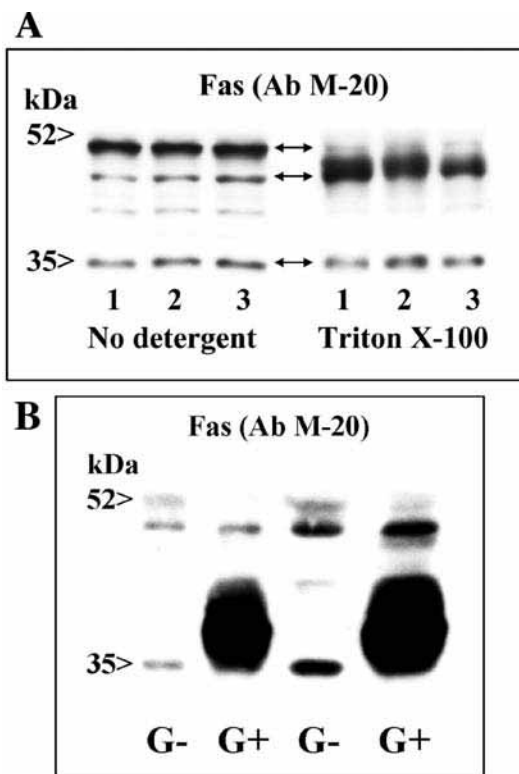


Fig. 2 **A** Immunodetection of Fas-related proteins (≈ 35 kDa native Fas and ≈ 48 and 51 kDa glycosylated Fas, *double arrows*) with antibody M-20 in the rat brain (cerebral cortex). The samples ($40 \mu\text{g}$ protein, three animals in each group) were prepared in the absence or presence of a nonionic detergent (Triton X-100). Note that protein extraction with Triton markedly improved the immunodetection of 48 kDa glycosylated Fas and blunted that of 51 kDa glycosylated Fas. **B** Immunodetection of Fas-related proteins with antibody M-20 in the rat cerebral cortex after receptor deglycosylation. The samples (18 and $36 \mu\text{g}$ protein, prepared with Triton X-100) were incubated in the absence (G-) or presence (G+) of the enzyme N-glycosidase F (15 units for 3 h at 37°C). Note that N-deglycosylation of Fas receptor induced a marked increase in the expression of native 35 kDa Fas and related peptides ($\approx 43/45$ kDa). The apparent molecular masses of Fas-related proteins were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left hand side

51 kDa Fas blunted (Fig. 2A). Protein extraction with this nonionic detergent also improved the immunodetection of native 35 kDa Fas (antibody M-20), glycosylated 51 kDa Fas (antibody C-20) and glycosylated 48- and 51-kDa Fas (antibody FL-335; see Figs. 1, 3). N-deglycosylation of Fas receptor induced a marked increase in the expression of native 35 kDa Fas and related peptides ($\approx 43/45$ kDa; Fig. 2B). Therefore, the effects of opiate and other drugs on Fas-related proteins were assessed in brain membranes extracted with Triton, and in which native 35 kDa Fas and glycosylated 48 kDa Fas were quantitated with antibody M-20, glycosylated 51 kDa Fas with antibody C-20, and both glycosylated forms of Fas also with antibody FL-335 (Fig. 3).

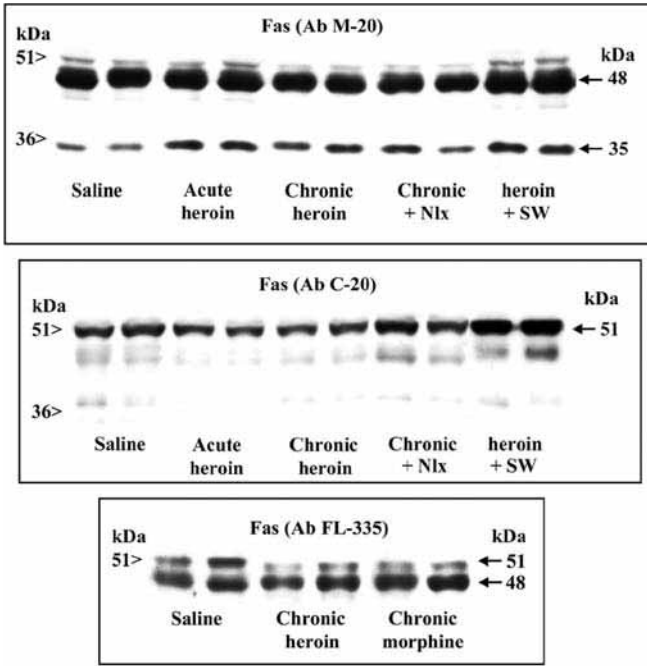


Fig. 3 Representative immunoblots of Fas-related proteins (≈ 35 kDa native Fas and ≈ 48 and 51 kDa glycosylated Fas, *arrows*) detected with different antibodies (M-20, C-20 and FL-335) in the rat cerebral cortex ($40 \mu\text{g}$ protein extracted with Triton) after various heroin and morphine treatments. Groups of treatments (two animals for each group): saline, acute heroin (10 mg/kg , i.p., 2 h), chronic heroin ($10\text{--}30 \text{ mg/kg}$ i.p. for 5 days), chronic heroin plus naloxone (*Nlx*, 2 mg/kg i.p. for 2 h), chronic heroin plus spontaneous withdrawal (*SW*, 48 h) and chronic morphine ($10\text{--}100 \text{ mg/kg}$ for 5 days; only for antibody FL-335). The apparent molecular masses of Fas-related proteins were determined by calibrating the blots with pre-stained molecular weight markers as shown on the left hand side. For a given antibody all samples were run in the same gel

Effects of heroin and other opiate drugs on Fas-related proteins in rat brain

The acute treatment with the μ -opioid receptor agonist heroin (10 mg/kg , i.p. for 2 h), compared with saline solu-

Fig. 4 Effects of acute and chronic treatments with heroin and of opiate withdrawal after the chronic treatment on the immunodensities of Fas-related proteins in the rat brain (cerebral cortex). Groups of treatments: saline, acute heroin (10 mg/kg , i.p., 2 h), chronic heroin ($10\text{--}30 \text{ mg/kg}$ i.p. for 5 days), chronic heroin plus naloxone (*Nlx*, 2 mg/kg i.p. for 2 h), chronic heroin plus spontaneous withdrawal (*SW*, 48 h). Quantitation of Fas-related proteins: 35 kDa native Fas and 48 kDa glycosylated Fas (antibody M-20); 51 kDa glycosylated Fas (antibody C-20), and 48 kDa and 51 kDa glycosylated Fas (antibody FL-335). Columns are means \pm SEM of five experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected significant differences between groups with respect to 35 kDa native Fas (antibody M-20) [$F(4,21)=5.77$, $p=0.005$] and 51 kDa glycosylated Fas (antibody C-20) [$F(4,21)=3.38$, $p=0.028$]. $*p<0.05$; $**p<0.01$ when compared with the corresponding saline group, and $\dagger p<0.05$ when compared with the chronic heroin group (ANOVA followed by Bonferroni's test). Chronic heroin treatment also reduced significantly the immunodensity of 51 kDa glycosylated Fas (antibody FL-335) $*p<0.05$ when compared with the saline group (Student's two-tailed t -test)

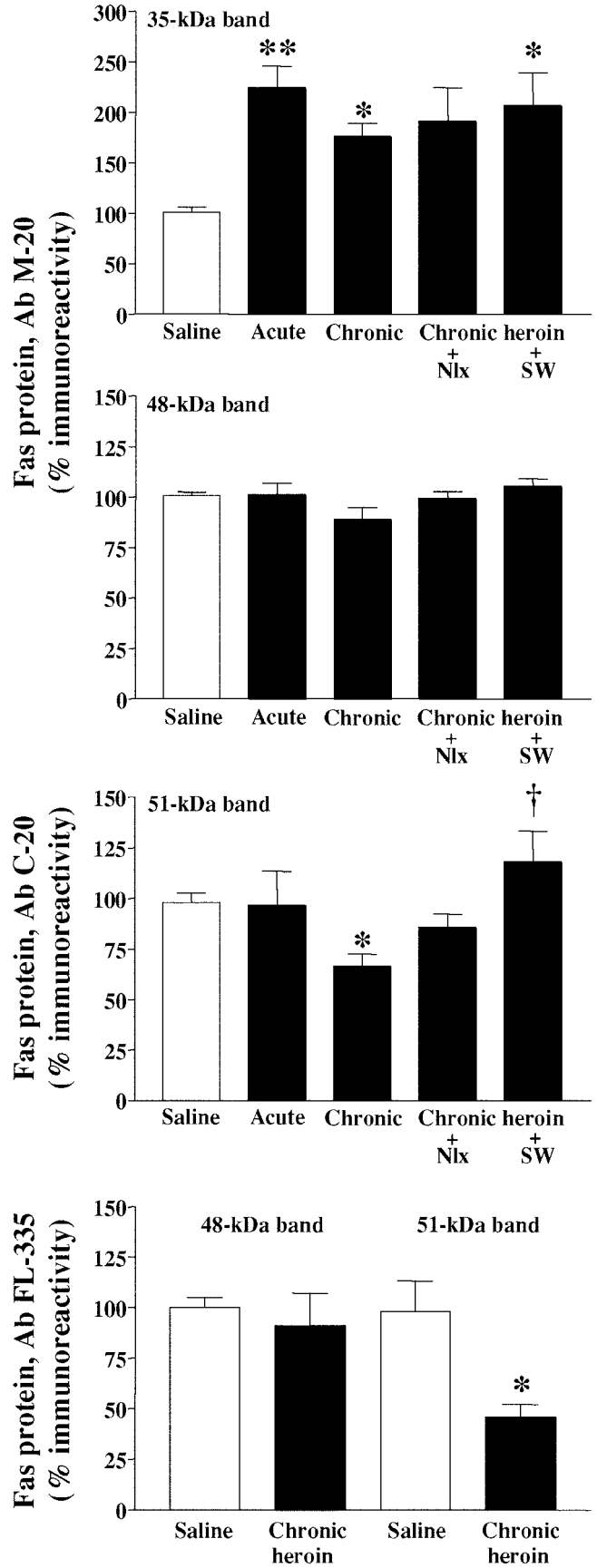


Table 1 Changes in Fas receptor protein immunoreactivities induced by various opiate drugs (heroin, morphine, μ -agonists; SNC-80, δ -agonist; U50488-H, κ -agonist) and σ_1 ligands (pentazocine, SKF10047, BD1063) in the rat cerebral cortex. Each value

represents the mean \pm SEM (expressed as percentage of the corresponding saline group [100%]) of n experiments per group with one animal per experiment. See Materials and methods for experimental details. SW spontaneous withdrawal, NT not tested

Treatment (time)	Dose (mg/kg)	Antibody M-20			Antibody 51 kDa	C-20 n
		35 kDa	48 kDa	n		
Acute heroin (2 h)	10	224 \pm 22**	101 \pm 6	5	97 \pm 16	5
Chronic heroin (5 days)	5–30	176 \pm 13*	89 \pm 6	5	67 \pm 6*	5
+ Naloxone (2 h)	2	191 \pm 33	99 \pm 3	5	86 \pm 6	5
+ SW (48 h)	–	207 \pm 32*	105 \pm 4	5	118 \pm 15 [†]	5
Acute morphine (2 h)	30	136 \pm 8*	117 \pm 5	4	NT	
Chronic morphine (5 days)	10–100	145 \pm 7**	142 \pm 5**	4	NT	
Acute SNC-80 (2 h)	10	90 \pm 7	97 \pm 7	5	97 \pm 4	5
Acute U 50488-H (2 h)	10	119 \pm 9	102 \pm 7	4	95 \pm 2	4
Acute pentazocine (2 h)	15	95 \pm 10	118 \pm 9	3	97 \pm 5	3
Chronic pentazocine (5 days)	10–80	52 \pm 6**	62 \pm 9**	5	53 \pm 5***	5
Acute (+) SKF 10047 (2 h)	5	74 \pm 6*	93 \pm 6	4	93 \pm 9	4
Acute BD 1063 (2.5 h)	10	101 \pm 11	99 \pm 9	3	102 \pm 10	3
Acute BD + SKF	10+5	96 \pm 6	95 \pm 5	4	89 \pm 9	4
Chronic SKF 10047 (3 days)	3–10	61 \pm 6**	106 \pm 5	5	100 \pm 2	5

* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.0001 when compared with its saline group; [†] p <0.05 when compared with the chronic heroin group (ANOVA followed by Bonferroni's test or Student's t -test)

tion administration, induced a marked increase in the immunodensity of 35 kDa native Fas in the rat cerebral cortex (124%, p <0.01) (Figs. 3 top, and 4). In contrast, acute heroin treatment did not alter significantly the immunodensities of 48- and 51-kDa glycosylated Fas in rat brain (Figs. 3, top and middle, 4; Table 1). Chronic treatment with heroin (5–30 mg/kg for 5 days) also was associated with an increase in the immunodensity of 35 kDa native Fas in rat the cerebral cortex (76%, p <0.05) (Figs. 3 top, 4), but this effect was less pronounced than that induced by the acute treatment, which suggested the induction of tolerance. Chronic heroin treatment did not modify significantly the immunodensity of 48 kDa glycosylated Fas (Figs. 3, top and bottom, 4; antibodies M-20 and FL-335) but decreased that of 51 kDa glycosylated Fas (33%, p <0.05 with antibody C-20; and 54%, p <0.05 with antibody FL-335; Figs. 3, middle and bottom, 4; Table 1).

Acute (30 mg/kg, i.p. for 2 h) and chronic treatment with morphine (10–100 mg/kg for 5 days) also increased the content of 35 kDa native Fas in the rat cerebral cortex (36% and 45%, p <0.05, respectively) (Table 1). Moreover, chronic morphine induced an increase in the immunodensity of 48 kDa glycosylated Fas (42%, p <0.01, Table 1, antibody M-20, and 43%, p <0.01, Fig. 3 bottom, antibody FL-335) and a decrease in that of 51 kDa glycosylated Fas (45%, p <0.05, Fig. 3 bottom, antibody FL-335).

Acute treatments with the opiate drugs SNC-80 (a selective δ -receptor agonist, 10 mg/kg i.p. for 2 h) or U 50488-H (a selective κ -receptor agonist, 10 mg/kg i.p. for 2 h) did not modify significantly the immunodensity of native or glycosylated Fas in the rat cerebral cortex (Table 1), which indicated that the rapid modulation of Fas proteins in the brain is related to the activation of μ -opioid receptors (heroin and morphine).

Effects of heroin withdrawal after chronic opiate treatment on Fas-related proteins in rat brain

In heroin-dependent rats (5–30 mg/kg for 5 days), naloxone (2 mg/kg)-precipitated withdrawal (2 h) or spontaneous opiate withdrawal (48 h) did not modify significantly the already increased immunodensities of 35 kDa native Fas (91%, p =0.06, and 107%, p <0.05, when compared to saline). Opiate withdrawal, like chronic heroin, did not induce significant changes in the content of 48-kDa glycosylated Fas (Figs. 3, top and middle, 4; Table 1). In these heroin-dependent rats, however, spontaneous opiate withdrawal (48 h) resulted in up-regulation in the density of 51-kDa glycosylated Fas (51% when compared to chronic heroin; Figs. 3 middle, 4; Table 1).

Effects of pentazocine and other σ ligands on Fas-related proteins in rat brain

The acute treatment with pentazocine (15 mg/kg, i.p. for 2 h), a σ_1 receptor agonist and a mixed nonselective δ/κ -opioid receptor agonist and μ -antagonist, did not modify significantly the immunodensity of native or glycosylated Fas in the rat cerebral cortex (Table 1). In contrast, chronic treatment with pentazocine (10–80 mg/kg for 5 days) resulted in marked decreases in the immunodensities of 35 kDa native Fas (48%, p <0.01), 48 kDa glycosylated Fas (38%, p <0.01 with antibody M-20, and 46%, p <0.01 with antibody FL-335), and 51 kDa glycosylated Fas (47%, p <0.0001 with antibody C-20, and 82%, p <0.0001 with antibody FL-335; Figs. 5, 6) in the brain (Table 1).

The acute treatment with the selective σ_1 receptor agonist (+) SKF 10047 (5 mg/kg i.p. 2 h) decreased the con-

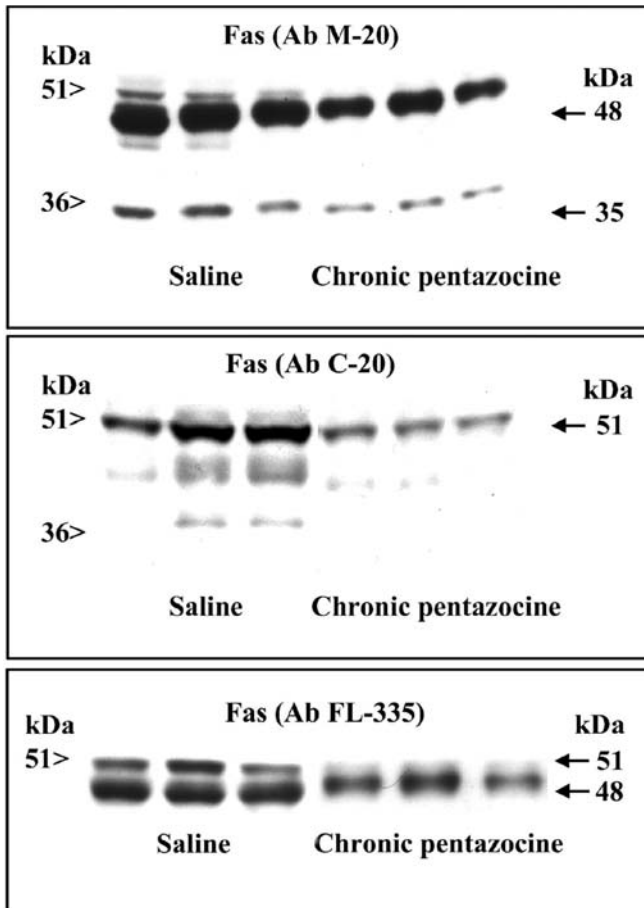


Fig. 5 Representative immunoblots of Fas-related proteins (≈ 35 kDa native Fas and ≈ 48 and 51 kDa glycosylated Fas, arrows) detected with different antibodies (M-20, C-20 and FL-335) in the rat cerebral cortex ($40 \mu\text{g}$ protein extracted with Triton) after chronic pentazocine administration. Groups of treatments (three animals for each group): saline and chronic pentazocine ($10\text{--}80$ mg/kg i.p. for 5 days). The apparent molecular masses of Fas-related proteins were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left hand side. For a given antibody all samples were run in the same gel

tent of 35 kDa native Fas (26% , $p < 0.05$), but not that of glycosylated Fas, in the rat cerebral cortex (Table 1). This inhibitory effect on native Fas was antagonized by BD 1063, a selective σ_1 receptor antagonist (Table 1). Chronic treatment of rats with (+)-SKF 10047 ($3\text{--}10$ mg/kg for 3 days) also resulted in a sustained decrease in 35 kDa native Fas in the brain (37% , $p < 0.01$) (Fig. 7, Table 1).

Effects of heroin, morphine and pentazocine, and of naloxone-precipitated heroin withdrawal on dynamin content in rat brain

The acute treatments with heroin (10 mg/kg, i.p. for 2 h) and morphine (30 mg/kg i.p. for 2 h), compared with saline solution administration, induced marked increases in the immunodensity of dynamin in the rat cerebral cortex (heroin: 39% , $p < 0.01$; morphine: 85% , $p < 0.001$; Fig. 8). Chronic

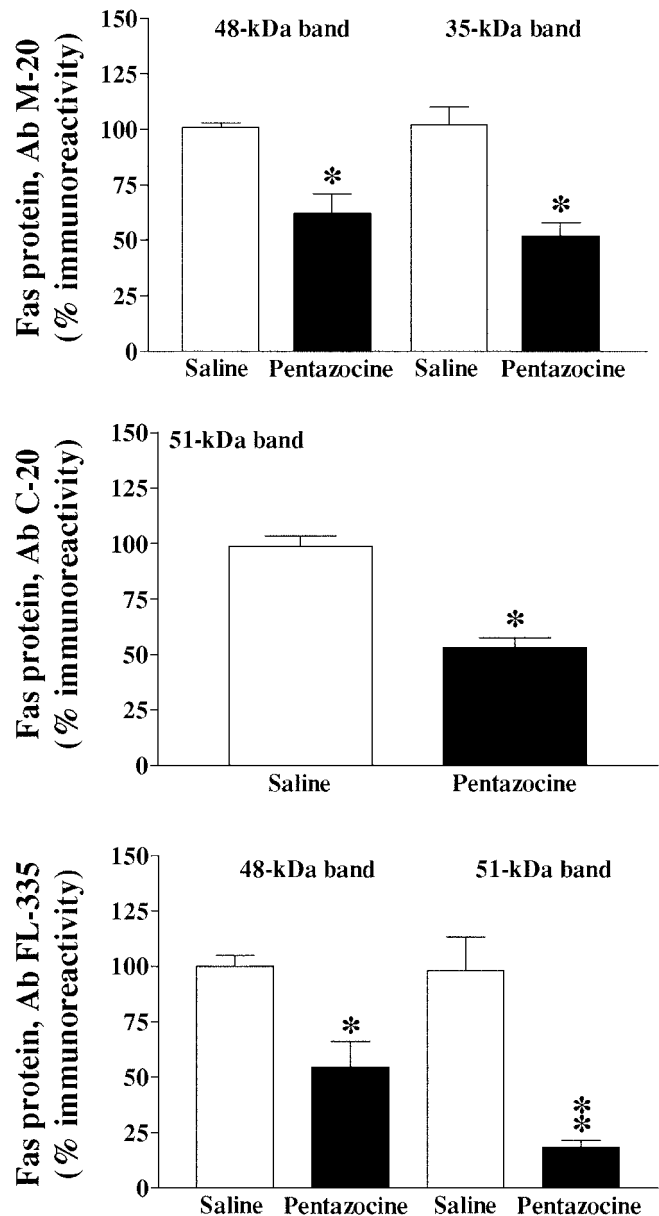


Fig. 6 Effect of chronic treatment with pentazocine on the immunodensities of Fas-related proteins in the rat brain (cerebral cortex). Groups of treatments: saline and chronic pentazocine ($10\text{--}80$ mg/kg i.p. for 5 days). Quantitation of Fas-related proteins: 48 kDa glycosylated Fas and 35 kDa native Fas (antibody M-20); 51 kDa glycosylated Fas (antibody C-20), and 48 kDa and 51 kDa glycosylated Fas (antibody FL-335). Columns are means \pm SEM of five experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. * $p < 0.01$; ** $p < 0.0001$ when compared with the corresponding saline group (Student's two-tailed t -test)

treatments (5 days) with heroin ($5\text{--}30$ mg/kg) and morphine ($10\text{--}100$ mg/kg) were also associated with up-regulations in the content of dynamin in the brain (heroin: 30% , $p < 0.05$; morphine: 47% , $p < 0.05$), but these effects were less pronounced, although statistically not significant, than those induced by the acute treatments (especially in the case of morphine), which might suggest the

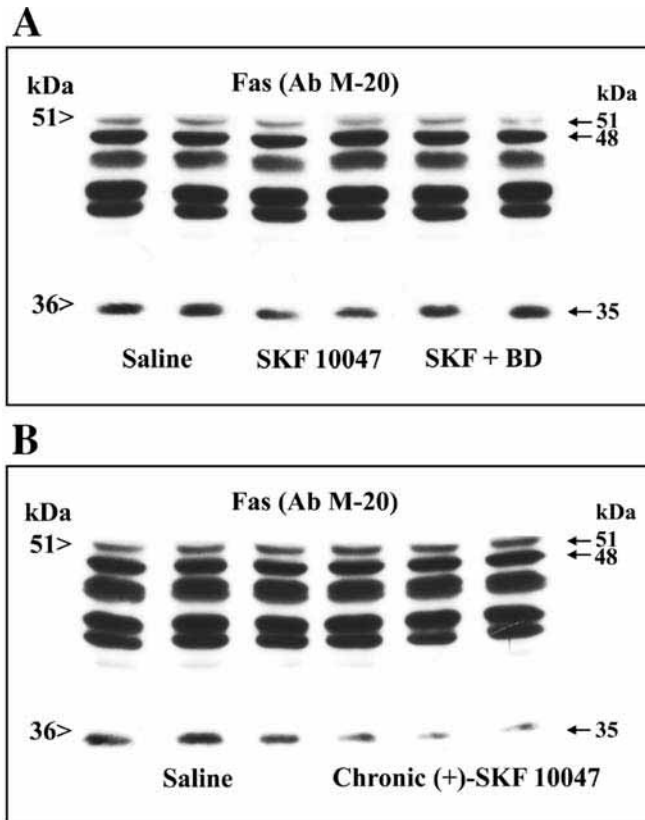


Fig. 7 Representative immunoblots of Fas-related proteins (≈ 35 kDa native Fas and ≈ 48 and 51 kDa glycosylated Fas, arrows) detected with antibody M-20 (batch F251) in the rat cerebral cortex ($40 \mu\text{g}$ protein extracted with Triton) after **A** acute treatment with the selective σ_1 receptor agonist (+)-SKF 10047 and its interaction with the σ_1 antagonist BD 1063, and **B** chronic (+)-SKF 10047 administration. Groups of treatments (two or three animals for each group): saline, acute (+)-SKF 10047 (5 mg/kg i.p. for 2 h), acute BD 1063 (10 mg/kg i.p. for 2.5 h) + SKF 10047, and chronic SKF 10047 ($3\text{--}10 \text{ mg/kg}$ i.p. for 3 days). The apparent molecular masses of Fas-related proteins were determined by calibrating the blots with pre-stained molecular weight markers as shown on the left hand side. For **A** and **B** all samples were run in the same gel. Note that batch F251 for antibody M-20 (compared with batch D219 in Figs. 2, 3, 5) detected Fas related peptides of $\approx 44/46$ kDa that were also immunodetected in mouse and human brains (see Fig. 1, top; batch D219)

induction of tolerance (Fig. 8). Chronic pentazocine treatment ($10\text{--}80 \text{ mg/kg}$ for 5 days) also induced an increase in the immunodensity of dynamin in the rat cerebral cortex (51% , $p < 0.05$) (data not shown). In heroin-dependent rats ($5\text{--}30 \text{ mg/kg}$ for 5 days), naloxone (2 mg/kg)-precipitated withdrawal (2 h) induced a marked up-regulation in the immunodensity of dynamin in the brain (74% , $p < 0.001$), which was significantly greater (44% , $p < 0.01$) than that observed after chronic heroin administration (Fig. 8).

Discussion

The immunodetection of Fas-related proteins (≈ 35 kDa native Fas and ≈ 48 and 51 kDa glycosylated Fas) in rat,

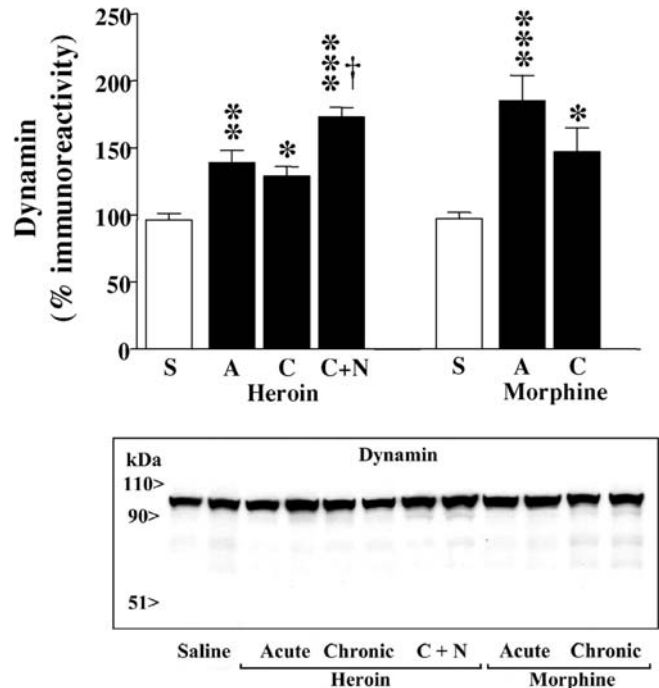


Fig. 8 Effects of acute and chronic treatments with heroin or morphine and of heroin withdrawal after the chronic treatment on the immunodensity of dynamin in the rat brain (cerebral cortex). Groups of treatments: saline (S), acute heroin (A, 10 mg/kg i.p., 2 h), chronic heroin (C, $10\text{--}30 \text{ mg/kg}$ i.p. for 5 days), chronic heroin plus naloxone (C+N, 2 mg/kg i.p. for 2 h), acute morphine (30 mg/kg i.p., 2 h) and chronic morphine ($10\text{--}100 \text{ mg/kg}$ i.p. for 5 days). Columns are means \pm SEM of 4–8 (heroin) or 6–8 (morphine) experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected significant differences between groups with respect to dynamin immunodensity after heroin [$F(3,16)=22.7$, $p < 0.0001$] and morphine [$F(2,17)=10.61$, $p = 0.001$] treatments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when compared with the corresponding saline group, and † $p < 0.01$ when compared with the chronic heroin group (ANOVA followed by Bonferroni's test). *Bottom*: Representative immunoblots for the effects of the various heroin and morphine treatments (two animals for each group, $40 \mu\text{g}$ protein extracted with Triton) on the immunodensity of dynamin in the rat cerebral cortex (all samples were run in the same gel). The apparent molecular mass of dynamin was determined by calibrating the blots with pre-stained molecular weight markers as shown on the left hand side

mouse and human brains, as well as in SH-SY5Y neuroblastoma cells, was in good agreement with previous studies in various human cell lines, which used similar antibodies directed against the cytoplasmic domain of Fas (Kamitani et al. 1997). In Fas-deficient mice (disruption of the Fas gene by deletion of exon 9 coding for the receptor cytoplasmic region), normal size Fas mRNA and Fas-related proteins ($\approx 40\text{--}45$ kDa) were not expressed in thymocytes (Adachi et al. 1995). The heterogeneity of Fas expression in the mammal brain is most likely due to differential glycosylation of the two N-linked glycosylation sites in the extracellular domain of Fas (Itoh et al. 1991; Watanabe-Fukunaga et al. 1992; Kamitani et al. 1997; Kramer 2000), the expression of which apparently depends on sample preparation (e.g., protein extraction with the

nonionic detergent Triton X-100 improved the immunodetection of glycosylated Fas).

The major findings of the current study are that chronic heroin treatment (tolerant state) modulated differentially Fas receptor proteins (up-regulation of 35 kDa native Fas and down-regulation of 51 kDa glycosylated Fas) and that spontaneous heroin withdrawal (dependent state) was associated with increases of these forms of Fas in the brain (i.e. a sustained increase for native Fas and the induction of up-regulation for glycosylated Fas). Moreover, chronic morphine also induced up-regulation of 35 kDa native Fas. Interestingly, acute treatments with the μ -agonists heroin and morphine, but not with selective δ - and κ -agonists, increased the content of native Fas, which clearly indicated the involvement of μ -opioid receptors in the rapid modulation of Fas in the brain. The results extend previous findings on the modulation of Fas receptor (48 kDa glycosylated protein) in morphine-dependent rats, which was mediated through a naloxone-sensitive mechanism (Boronat et al. 2001). The results also confirm the general observation that activation of opioid receptors (mainly the μ -type) induces an increase in the expression of Fas receptor mRNA and protein in various tissues and cells (Yin et al. 1999, 2000; Chatzaki et al. 2001; Singhal et al. 2002; Wang et al. 2002). In this context, it is of interest to note that the basal immunodensity of 35 kDa native Fas was found decreased (30%, $n=5$, $p<0.05$) in μ -opioid receptor deficient mice (García-Fuster et al., unpublished results), suggesting that μ -receptors tonically stimulate, through endogenous opioid peptides, the activation of Fas in the brain. The content of glycosylated Fas proteins (48- and 51-kDa peptides) was not changed in μ -deficient mice (unpublished results; see also Wang et al. 2002). Moreover, the basal expression of 35 kDa native Fas was not modified in brains of δ - or κ -opioid receptor deficient mice (unpublished results). These data agree with the observed stimulating effects of acute heroin and morphine on 35 kDa Fas in rat brain and indicate the involvement of μ -opioid receptors in mediating the effects of these opiate agonists.

In a previous study, chronic morphine was associated with an increased content of 48 kDa Fas in the brain (Boronat et al. 2001). In the present study, chronic morphine also increased this glycosylated Fas form but decreased other (51 kDa protein). However, chronic heroin (and heroin withdrawal) did not alter 48 kDa glycosylated Fas in rat brain. The reason for this discrepancy is not known. Although morphine and heroin (diacetyl-morphine) may differ in some effects (Schuller et al. 1999), the *in vivo* efficacies of heroin, 6-acetylmorphine and morphine were shown to be mediated by pharmacologically similar populations of μ -opioid receptors (Negus et al. 2003). In any case, the current results indicate that heroin and morphine addiction in rats (tolerant and/or dependent states) is associated with up-regulation of 35 kDa native Fas (and with different expressions of glycosylated Fas) in the brain. At present, the molecular mechanisms by which heroin and other opiate drugs modulate the Fas receptor in the brain are not known. It is unclear whether the opioid re-

ceptors and the Fas receptor are physically associated or influence each other at the level of their signaling pathways. In a recent *in vitro* study (Singhal et al. 2002), morphine was shown to enhance the expression of FasL/Fas in macrophages which led to cell apoptosis, and this effect was mediated by opioid receptors via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation. The MAPK and/or the modulation of other signaling pathways (one possibility would be through the interaction of inhibitory Gi/o proteins activated by opiate drugs and the Fas adaptor molecule FADD recruited after receptor stimulation) could also be involved in mediating the effects of opiate drugs on Fas in the brain.

In contrast to the acute and chronic effects of heroin and morphine on 35 kDa native Fas (up-regulation), chronic (\pm)-pentazocine induced down-regulation of native Fas in rat brain. Chronic pentazocine, but not chronic heroin, also reduced 48 kDa glycosylated Fas, and both treatments decreased 51 kDa glycosylated Fas in the brain. Pentazocine, a former "agonist-antagonist" opiate analgesic agent, is also a potent σ_1 receptor agonist (Mei and Pasternak 2001 and other references therein). Both enantiomers of pentazocine have good affinities for the cloned σ_1 receptor (Ki: 2.5–18 nM; Mei and Pasternak 2001), but (–)-pentazocine also has good affinity for the cloned μ - (Ki: 5.7 nM, antagonist), κ - (Ki: 7.2 nM, agonist) and δ - (Ki: 31 nM, agonist) opioid receptors (Raynor et al. 1994; Craft and McNiel 2003). Among other features, the receptors defined as σ are not longer opioid receptors and therefore they are naloxone-inaccessible (Quirion et al. 1992). Since chronic treatment with a high dose of naloxone (10 mg/kg for 13 days) did not alter the expression of Fas in the rat brain (Boronat et al. 2001), the inhibitory effects of chronic pentazocine on Fas cannot be related to its μ -antagonist properties. Similarly, acute treatments with selective δ - (SNC-80) and κ - (U 50488-H) agonists did not decrease Fas in the brain. In contrast, acute and chronic treatments with the selective σ_1 receptor agonist (+)-SKF 10047 decreased, through a σ_1 receptor-specific mechanism, the content of 35 kDa native Fas in the brain. It is of interest to note that the density of glycosylated Fas was also reduced by chronic pentazocine but not by the σ_1 agonist, suggesting that the former drug is also able to impair the proper post-translational modification of Fas receptor. At the functional level the σ_1 receptors comprise a potent anti-opioid system, the activation of which by (+)-pentazocine markedly reduces opiate analgesia in mice (Mei and Pasternak 2002). In line with this concept (anti-opioid effect), the down-regulation induced by chronic pentazocine on native Fas is also opposite to the up-regulation induced by heroin and morphine, and both effects are mediated through different receptor mechanisms.

Dynamin is a neuronal phosphoprotein and a GTPase enzyme that plays an essential role in receptor-mediated endocytosis via clathrin-coated pits and caveoli (McClure and Robinson 1996). In the current study, chronic opiate drug treatments (heroin, morphine) and opiate withdrawal (heroin) resulted in marked up-regulations in the content of dynamin in the brain, indicating the importance of this

molecular target in opiate addiction. These results confirm and extend previous observations on the modulation of dynamin in morphine addiction (Noble et al. 2000). Conversely, chronic treatment with naltrexone, an opioid receptor antagonist, was associated with down-regulation (30%) of dynamin in mouse spinal cord (Patel et al. 2002). Moreover, the present data also indicate that acute heroin (10 mg/kg, 2 h) and morphine (30 mg/kg, 2 h) treatments resulted in up-regulation of dynamin in the rat cerebral cortex, which indicates its rapid modulation by opiate drugs. Furthermore, chronic pentazocine also up-regulated dynamin content in rat brain, which also suggests the involvement of σ_1 receptors in its regulation. The up-regulation of dynamin by opiate drugs could contribute to the plasticity of the endogenous opioid system, which is relevant in the development of tolerance and dependence to opiate drugs (see Noble et al. 2000). In this context, the up-regulation of dynamin in specific brain regions could regulate the level of expression of opioid receptors through modulation of receptor internalization induced by opiate drugs (Murray et al. 1998; Whistler and Von Zastrow 1999).

In conclusion, chronic heroin and morphine treatments and heroin withdrawal in rats are associated with up-regulation of 35 kDa native Fas (and with different expressions of glycosylated Fas) in the brain. At present, the functional consequences of the up-regulation of Fas receptor in opiate addiction are not known. Opiate drugs can promote, through the activation of Fas, abnormal cell death (Yin et al. 1999, 2000; Chatzaki et al. 2001; Singhal et al. 2002; Wang et al. 2002), but most neurons are resistant to Fas-induced apoptosis (Raoul et al. 2002). Alternatively, Fas could function as a non-apoptotic signal transducer (Wajant 2002; Desbarats et al. 2003), and in this case it would represent a new component in the opioid receptor signaling cascade potentially modulated by opiate drugs.

Acknowledgements This study was supported by grant BFI2000-0306 from MCT (Madrid, Spain) and by grant 32.57066.99 from FNSRS (Bern, Switzerland). M.J.G.-F. was supported by a predoctoral fellowship from CSIC/MECD-Associated Units. J.A. García-Sevilla is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Spain).

References

- Adachi M, Suematsu S, Kondo T, Ogasawara T, Tanaka T, Yoshida N, Nagata S (1995) Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Gen* 11:294-300
- Badorff C, Ruetten H, Mueller S, Stahmer M, Gehring D, Jung F, Ihling C, Zeiher AM, Dimmeler S (2002) Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 β and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J Clin Invest* 109:373-381
- Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain. *Glia* 27:62-74
- Boronat MA, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2001) Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *Br J Pharmacol* 134:1263-1270
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Chatzaki E, Makrigrannakis A, Margioris AN, Kouimtoglou E, Gravanis A (2001) The Fas/FasL apoptotic pathway is involved in κ -opioid-induced apoptosis of human endometrial stromal cells. *Mol Human Reprod* 7:867-874
- Choi C, Park JY, Lee J, Lim J-H, Shin E-C, Ahn Y, Kim C-H, Kim S-J, Kim J-D, Choi IS, Choi I-H (1999) Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- α , or IFN- γ . *J Immunol* 162:1889-1895
- Craft RM, McNeil DM (2003) Agonist/antagonist properties of nalbuphine, butorphanol and (-)-pentazocine in male vs. female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 75:235-245
- Desbarats J, Birge RB, Minouni-Rongy M, Weistein DE, Palerme J-S, Newell MK (2003) Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5:118-125
- Ferrer-Alcón M, La Harpe R, Guimón J, García-Sevilla JA (2003) Down-regulation of neuronal cdk5/p35 in opioid addicts and opiate-treated rats: relation to neurofilament phosphorylation. *Neuropsychopharmacology* 28:947-955
- Gabilondo AM, García-Sevilla JA (1995) Spontaneous withdrawal from long-term treatment with morphine accelerates the turnover of α_2 -adrenoceptors in rat brain: up-regulation of receptors associated with increased receptor appearance. *J Neurochem* 64:2590-2597
- García-Fuster MJ, Ferrer-Alcón M, Miralles A, García-Sevilla JA (2002) Modulation of pro-apoptotic Fas receptor proteins during heroin addiction in rat brain. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24 [Suppl A]:161
- García-Sevilla JA, Ventayol P, Busquets X, La Harpe R, Walzer C, Guimón J (1997) Marked decrease of immunolabelled 68 kDa neurofilament (NF-L) proteins in brains of opiate addicts. *Neuroreport* 8:1561-1565
- Harlow E, Lane D (1999) Using antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yohenara M, Mizushima S-I, Same-shima M, Hase A, Seto Y, Nagata S (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233-243
- Kamitani T, Nguyen HP, Yeh ETH (1997) Activation-induced aggregation and processing of the human fas antigen. Detection with cytoplasmic domain-specific antibodies. *J Biol Chem* 272:22307-22314
- Krammer PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-795
- López E, Ferrer I (2000) Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Mol Brain Res* 85:61-67
- MacEwan DJ (2002) TNF ligands and receptors – a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 135:855-875
- Matsuno K, Senda T, Kobayashi T, Mita S (1995) Involvement of σ_1 receptor in (+)-N-allylnormetazocine-stimulated hippocampal cholinergic functions in rats. *Brain Res* 690:200-206
- McClure SJ, Robinson PJ (1996) Dynamin, endocytosis and intracellular signalling. *Mol Membr Biol* 13:189-215
- McCracken KA, Bowen WD, Matsumoto RR (1999) Novel σ receptor ligands attenuate the locomotor stimulatory effects of cocaine. *Eur J Pharmacol* 365:35-38
- Mei J, Pasternak W (2001) Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma $_1$ receptor. *Biochem Pharmacol* 62:349-355
- Mei J, Pasternak W (2002) σ_1 Receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 300:1070-1074
- Murray SR, Evans CJ, Von Zastrow M (1998) Phosphorylation is not required for dynamin-dependent endocytosis of a truncated mutant opioid receptor. *J Biol Chem* 273:24987-24991

- Nagata S (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Ann Rev Gen* 33: 29–55
- Nagata S, Golstein P (1995) The Fas death receptor. *Science* 267: 1449–1456
- Negus SS, Brandt MR, Gatch MB, Mello NK (2003) Effects of heroin and its metabolites on schedule-controlled responding and thermal nociception in rhesus monkeys: sensitivity to antagonism by quadazocine, naltrindole and β -funaltrexamine. *Drug Alcohol Depend* 70:17–27
- Noble F, Szücs M, Kieffer B, Roques BP (2000) Overexpression of dynamin is induced by chronic stimulation of μ - but not δ -opioid receptors: relationship with μ -related morphine dependence. *Mol Pharmacol* 58:159–166
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth B, Ponstingl H, Krammer P (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family. *J Biol Chem* 267:10709–10715
- Orlinick JR, Vaishnav AK, Elkon KB (1999) Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol* 18:293–308
- Ozaita A, Escribá PV, García-Sevilla JA (1999) The alkylating agent EEDQ facilitates protease-mediated degradation of the human brain α_{2A} -adrenoceptor as revealed by a sequence-specific antibody. *Neurosci Lett* 263:105–108
- Papakonstanti EA, Bakogeorgou E, Castanas E, Emmanouel DS, Hartig R, Stournaras C (1998) Early alterations of actin cytoskeleton in OK cells by opioids. *J Cell Biochem* 70:60–69
- Patel M, Gomes B, Patel V, Yoburn BC (2002) Antagonist-induced μ -opioid receptor up-regulation decreases G-protein receptor kinase-2 and dynamin-2 abundance in mouse spinal cord. *Eur J Pharmacol* 446:37–42
- Quirion R, Bowen WD, Itzhak Y, Junien JL, Musacchio JM, Rothman RB, Su T-P, Tam SW, Taylor DP (1992) A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacol Sci* 13:85–86
- Raoul C, Estévez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyrière O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas: potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067–1083
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45:330–334
- Sastry PS, Rao KS (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74:1–20
- Schuller AGP, King MA, Zhang J, Bolan E, Pan Y-X, Morgan DJ, Chang A, Czick ME, Unterwald EM, Pasternak GW, Pintar JE (1999) Retention of heroin and morphine-6 β -glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nat Neurosci* 2:151–156
- Siegel RM, Ka-Ming Chang F, Chun HJ, Lenardo MJ (2000) The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 1:469–474
- Singhal PC, Bhaskaran M, Patel J, Patel K, Kasinath BS, Duraisamy S, Franki N, Reddy K, Kapasi AA (2002) Role of P38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Fas-Fas ligand interaction in morphine-induced macrophage apoptosis. *J Immunol* 168:4025–4033
- Tada Y, O-Wang J, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Okada S, Tokuhisa T, Sakiyama S, Tagawa M (2002) A novel role for Fas ligand in facilitating antigen acquisition by dendritic cells. *J Immunol* 169:2241–2245
- Ventayol P, Busquets X, García-Sevilla JA (1997) Modulation of immunoreactive protein kinase C- α and β isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 355:491–500
- Wajant H (2002) The Fas signalling pathway: more than a paradigm. *Science* 296:1635–1636
- Wang J, Charboneau R, Barke RA, Loh HH, Roy S (2002) μ -Opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 169:3630–3636
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S (1992) The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 148:1274–1279
- Whistler JL, Von Zastrow M (1999) Dissociation of functional roles of dynamin in receptor-mediated endocytosis and mitogenic signal transduction. *J Biol Chem* 274:24575–24578
- Yin D, Mufson RA, Wang R, Shi Y (1999) Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature* 397:218
- Yin D, Tuthill D, Mufson RA, Shi Y (2000) Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J Exp Med* 191:1423–1428
- Yu VC, Richards ML, Sadée W (1986) A human neuroblastoma cell line expresses μ and δ opioid receptor sites. *J Biol Chem* 261:1065–1070
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802–809

ARTÍCULO III

ARTÍCULO III

Deglycosylation of Fas receptor and chronic morphine treatment up-regulate high molecular mass Fas aggregates in the rat brain.

M. Julia García-Fuster, Marcel Ferrer-Alcón, Antonio Miralles, Jesús A. García-Sevilla.

European Journal of Pharmacology 496: 63-69 (2004).

Este trabajo se centró en la identificación y cuantificación en tejido cerebral de agregados de Fas (formas triméricas y otras de mayor masa molecular) que se han descrito en estudios *in vitro* como iniciadoras de la señalización de este receptor inductor de muerte celular (el receptor Fas trimeriza tras asociarse con su ligando Fas-L). Se demostró que ciertos agentes alquilantes (NEM, NMM) pueden reducir la expresión de agregados de Fas al tiempo que aumentan la forma monomérica del receptor, poniendo de manifiesto una clara relación entre estas dos formas de Fas. Asimismo pudo demostrarse que la deglicosilación del receptor Fas regula (aumentando) la expresión de estas formas agregadas del receptor. La administración crónica de morfina también se asoció con un incremento de los agregados de Fas, igual que sucede con las formas monoméricas y glicosiladas de este receptor. Los agonistas δ - y κ -opioide y los ligandos σ no modularon de forma significativa las formas agregadas de Fas. Así pues, la adicción a morfina en ratas se asoció con incrementos de densidad de todas las formas de expresión de Fas (receptor nativo, glicosilado y agregados).



Deglycosylation of Fas receptor and chronic morphine treatment up-regulate high molecular mass Fas aggregates in the rat brain

María Julia García-Fuster^a, Marcel Ferrer-Alcón^b, Antonio Miralles^a,
Jesús Andrés García-Sevilla^{a,b,*}

^aLaboratory of Neuropharmacology, Institut Universitari d' Investigació en Ciències de La Salut (IUNICS),
University of the Balearic Islands, E-07122 Palma de Mallorca, Spain

^bClinical Research Unit, Department of Psychiatry, University of Geneva, HUG Belle-Idée, CH-1225 Chêne-Bourg/GE, Switzerland

Received 19 February 2004; received in revised form 2 June 2004; accepted 8 June 2004

Abstract

This study was designed to immunodetect and characterize Fas receptor aggregates (oligomerization) in the brain and to assess its possible modulation in opiate addiction. High molecular mass, sodium dodecyl sulfate (SDS)- and β -mercaptoethanol-resistant Fas aggregates (\sim 110/120 and \sim 203 kDa specific peptides) were immunodetected with a cytoplasmic domain-specific antibody in brain tissue (rat, mouse and human) and SH-SY5Y cells by Western blot analysis. Preincubation of rat cortical membranes with *N*-ethylmaleimide (NEM; 1 mM for 1 h at 37 °C) reduced the immunodensity of \sim 203 kDa Fas aggregates (51%) and increased that of 35 kDa native Fas (172%) and 51/48 kDa glycosylated Fas (47%), indicating that disulfide bonds are involved in Fas dimerization. Enzymatic *N*-deglycosylation of Fas receptor increased the content of Fas aggregates (\sim 110/120 kDa: five- to sixfold, and \sim 203 kDa: two- to threefold), suggesting that Fas glycosylation is involved in regulating receptor dimerization. Chronic (10–100 mg/kg for 5 days), but not acute (30 mg/kg for 2 h), treatment with morphine (a μ -opioid peptide receptor agonist) induced up-regulation of Fas aggregates in the brain (\sim 110/120 kDa: 39%, and \sim 203 kDa: 89%). The acute and/or chronic treatments with δ - and κ -opioid peptide receptor agonists and with a σ_1 -receptor agonist did not readily alter the content of Fas aggregates in the rat brain. The results indicate that Fas aggregates are natively expressed in the brain and that its density is regulated by the state of Fas glycosylation. These forms of Fas (receptor homodimerization) are functionally relevant because they were up-regulated in the brain of morphine-dependent rats.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fas receptor aggregate; Fas protein; Deglycosylation; Opiate drug; Morphine addiction; Brain, rat

1. Introduction

The Fas receptor [also known as cytotoxicity-dependent protein (CD95) or apoptosis-1 protein (APO-1)] is a well-known transmembrane protein critically involved in the regulation of apoptosis (Nagata, 1999; Krammer, 2000; Sastry and Rao, 2000; Yuan and Yankner, 2000) which can also function as a nonapoptotic signal transducer (Siegel et al., 2000b; Badorff et al., 2002; Tada et al., 2002; Wajant, 2002; Desbarats et al., 2003). Although

initially restricted to the immune system, Fas protein is widely expressed in normal tissues (Watanabe-Fukunaga et al., 1992), including the brain of mammals (Bechmann et al., 1999; Choi et al., 1999; Boronat et al., 2001; García-Fuster et al., 2003). Native Fas receptor has a molecular mass of \sim 35 kDa, but after posttranslational modifications, mature Fas is mostly expressed as glycosylated proteins of \sim 45–52 kDa (the N-terminal domain of Fas contains two putative N-linked glycosylation sites at N22 and N93; Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992; Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Kamitani et al., 1997). In addition, high molecular mass (\sim 110 to $>$ 200 kDa), sodium dodecyl sulfate (SDS)- and β -mercaptoethanol-resistant Fas aggregates have been detected by Western blot analysis, immunoprecipitation and other techniques in various cell lines (Kischkel et al., 1995; Kamitani et al., 1997;

* Corresponding author. Laboratori de Neurofarmacologia, Institut Universitari d' Investigació en Ciències de La Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Cra. Valldemossa Km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Spain. Tel.: +34-971-17-31-48; fax: +34-971-17-31-84.

E-mail address: jesus.garcia-sevilla@uib.es (J.A. García-Sevilla).

Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000a; Algeciras-Schimmich et al., 2002). These Fas aggregates appears to be composed of a complex of intact Fas monomers (Kamitani et al., 1997), and this receptor homo-oligomerization appears to be the initial signaling form of Fas (Kischkel et al., 1995; Algeciras-Schimmich et al., 2002).

Recently, Fas receptor proteins (35-kDa native and 48-kDa glycosylated Fas) were shown to be modulated by acute and/or chronic treatments with various opiate drugs in the rat brain (Boronat et al., 2001; García-Fuster et al., 2003). Notably, the observed up-regulation of 35-kDa native Fas after chronic heroin/morphine treatment and heroin withdrawal (García-Fuster et al., 2003) clearly indicated a relevant role of Fas in opiate addiction either as promoter of abnormal cell death, but most neurones are resistant to Fas-induced apoptosis (Raoul et al., 2002), or as a new nonapoptotic signal transducer in the opioid receptor signaling pathways. It is not known, however, whether chronic opiate treatment can also modulate the formation of high molecular mass Fas aggregates, one of the earliest events in Fas signaling (Algeciras-Schimmich et al., 2002). On the other hand, recent findings in heterologous cellular systems indicated that heterodimerization of α_{2A} - and β_1 -adrenoceptors is regulated by receptor glycosylation (Xu et al., 2003), and this post-translational receptor modification could be also relevant in the regulation of Fas aggregates (homodimerization) in brain tissue.

In this context, the present study was designed to immunodetect and characterize high molecular mass Fas aggregates in brain tissue, to investigate the relation between Fas receptor glycosylation and the expression of Fas aggregates, and to assess whether chronic morphine treatment modulate these Fas forms in the rat brain. A preliminary report of a portion of this work was given at the X Congress of the Spanish Society of Neuroscience (García-Fuster et al., 2003).

2. Materials and methods

2.1. Dissociation of Fas aggregates and enzymatic deglycosylation of Fas receptor

For the dissociation of Fas aggregates, rat cortical membranes were incubated in sample buffer (see below) in the absence or presence of the lipophilic sulfhydryl alkylating reagents *N*-ethylmaleimide (NEM) or *N*-methylmaleimide (NMM; 1 mM for 1 h at 37 °C) to block native cysteine residues (the extracellular domain of Fas contains 18 cysteine residues; Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992). For the enzymatic deglycosylation of Fas receptor, cortical membranes were incubated in the absence or presence of *N*-glycosidase F (15 units for 3 h at 37 °C) as described previously (Ozaita et al., 1999; García-Fuster et al., 2003). Control and pretreated (NEM or *N*-glycosidase F) brain

membranes were then further prepared for the immunodetection of Fas receptor and Fas aggregates by Western blot analysis (all samples were denatured by incubation for 4 min at 95 °C in electrophoresis buffer prior to loading, see below).

2.2. Animals and treatments

Adult male Sprague–Dawley rats (200–250 g) were used. The rats were housed under controlled environmental conditions (22 °C, 70% humidity, and 12-h light/dark cycle) with free access to a standard diet and tap water. For the acute drug treatments, the rats received a single intraperitoneal (i.p.) injection of morphine (30 mg/kg), (+)-4-[(α R)- α -(2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl]-3-methoxybenzyl]-*N,N*-diethylbenzamide (SNC-80, 10 mg/kg), 1*S*-*trans*-(3,4-dichloro-*N*-methyl-*N*-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]-benzeneacetamide) (U 50488 HCl, 10 mg/kg) and (+)-*N*-allyl-normetazocine (SKF 10047, 5 mg/kg) (see García-Fuster et al., 2003 for details of these drugs). For the chronic treatment with morphine, the rats were injected i.p. three times daily during five consecutive days with increasing doses of the opiate (10–100 mg/kg), which resulted in a marked degree of opiate tolerance and dependence (García-Fuster et al., 2003). Other rats were chronically treated with (+)-SKF10047 (3–10 mg/kg for 3 days; García-Fuster et al., 2003). In all series of experiments, control rats received 0.9% saline vehicle or dimethyl sulphoxide (DMSO, in the case of SNC-80) i.p. (1 ml/kg) at the indicated treatment times. The animals were killed by decapitation 2 h after the last dose in the acute and chronic drug treatments. The brains were rapidly removed and specimens of the cerebral cortex were dissected on ice and stored at –80 °C until assay. This study was approved by the research and ethical review board of the Dirección General de Investigación (MCT, Madrid), and the experiments in rats followed the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication No. 85-23, revised 1985) and were performed according to the guidelines of the University of the Balearic Islands.

2.3. Brain samples and immunoblotting of Fas-related proteins

The preparation of rat brain samples and the immunodetection of Fas-related proteins were performed as described in detail previously (García-Fuster et al., 2003). Briefly, 150–200 mg of cerebral cortex was homogenised in 40 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, containing 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, and various protease inhibitors. After centrifugation (40,000 × g, 45 min), aliquots of the supernatant (total Fas content) were mixed with electrophoresis-loading buffer (50 mM Tris–HCl pH 6.8, 10% glycerol, 1.5% SDS, 2.5% β -mercaptoethanol), denatured and stored at –20 °C until use. In addition to rat brain, mouse (cerebral cortex)

and human (prefrontal cortex) brain samples and human SH-SY5Y neuroblastoma cells (a cell line that expresses MOP and DOP receptors; i.e. μ/δ -opioid peptide receptors; Yu et al., 1986) were also used for the immunodetection and characterization of Fas aggregates with the anti-Fas M-20 antibody (García-Fuster et al., 2003). Protein concentrations were determined by the biuret reaction using bicinchoninic acid for colorimetric detection of cuprous cation (BCA, Protein Assay Reagent, Pierce Chemical, Rockford, IL, USA). In routine experiments, 40 μg protein of each rat (and mouse or human) brain sample or SH-SY5Y cells (20 μg protein) was subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10% polyacrylamide minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated in a blocking solution containing the appropriate primary polyclonal antibody (affinity-purified): anti-Fas M-20 (rabbit polyclonal antibody raised against a peptide mapping the carboxyl terminus of Fas of mouse origin; dilution 1:2000; sc-716, batches D219 and F251, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) or anti-Fas C-20 (rabbit polyclonal antibody raised against a peptide mapping the carboxyl terminus of Fas of human origin [amino acids 300–319] (Kamitani et al., 1997); dilution 1:2000; sc-715, batch D172 Santa Cruz Biotechnology). The secondary antibody, horseradish peroxidase-linked anti-rabbit immunoglobulin G, was incubated at 1:5000 dilution in blocking solution at room temperature for 1 h. Immunoreactivity of Fas proteins was detected with the Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blot Detection system (Amersham International, Buckinghamshire, UK) and visualized by exposure to Hyperfilm ECL film (Amersham) for 2 to 15 min (autoradiograms).

2.4. Quantitation of immunodensities of Fas-related proteins

The autoradiograms were quantitated by densitometric scanning as described previously (García-Fuster et al., 2003). The amount of Fas in the cerebral cortex of rats treated with opiate drugs was compared in the same gel with that of control rats which received saline or DMSO solution. Experiments were performed by using 40 μg protein known to be within the linear range for immunolabeling of Fas-related proteins. The quantification procedure was assessed two to three times in different gels (each gel with different brain samples from saline/DMSO- and drug-treated rats). Finally, percent changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each rat treated with the specific drug in the various gels and the mean value used as a final estimate. A similar procedure was used to quantitate the effects of NEM and enzymatic deglycosylation (control versus pretreated membranes) on Fas proteins.

2.5. Data analyses and statistics

Results are expressed as mean \pm S.E.M. values. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test, and Student's two-tailed *t*-test were used for the statistical evaluations. The level of significance was chosen as $P=0.05$.

2.6. Drugs and chemicals

Opiate drugs (and their sources) included morphine HCl (Unión Químico-Farmacéutica S.A.E., Madrid, Spain), SNC-80 (Tocris Cookson, Avonmouth, UK), U-50488-HCl (Sigma/RBI, St. Louis, MO, USA) and (+)-SKF 10047 HCl (Tocris). The enzyme *N*-glycosidase F and the sulfhydryl alkylating reagents NEM and NMM were from Sigma. Acrylamide (Protogel) was from BDH Brunschwig (Dorset, UK). Other materials, such as the secondary antibodies, ECL reagents and autoradiography films, were purchased from Amersham International or Santa Cruz Biotechnology. All other chemicals were from Sigma.

3. Results

3.1. Immunodetection of Fas aggregates in brain tissue and in SH-SY5Y cells

High molecular mass, SDS- and β -mercaptoethanol-resistant Fas aggregates ($\sim 110/120$ and ~ 203 kDa) were readily detected in rat, mouse and human brain membranes as well as in human SH-SY5Y cells by Western blot analysis (Fig. 1). These peptides were specific Fas-related

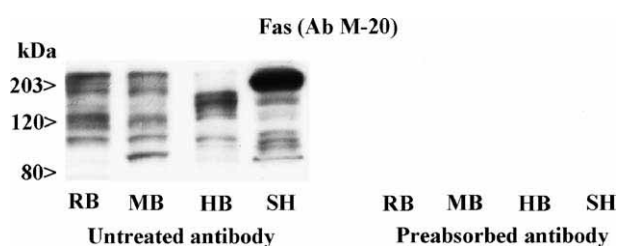


Fig. 1. Representative autoradiograph of Western blots depicting labelling of immunodetectable Fas receptor aggregates ($\sim 110/120$ - and ~ 203 -kDa peptides) with anti-Fas M-20 antibody in the rat brain (RB, cerebral cortex), mouse brain (MB, cerebral cortex), human brain (HB, prefrontal cortex) and human SH-SY5Y neuroblastoma cells (SH). The samples (40 μg protein for brain tissue and 20 μg protein for SH cells) were subjected to SDS-PAGE (under denaturing conditions), transferred to nitrocellulose membranes (immunoblotting), incubated with the specific primary and secondary antibodies, and visualized by the Enhanced Chemiluminescence method. The specificity of anti-Fas M-20 antibody was assessed by preincubating the antiserum with its antigenic peptide (preabsorbed antibody), which resulted in the blockade of the immunoreaction for the specific Fas aggregates. The apparent molecular masses of Fas aggregates were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left-hand side.

proteins because preincubation of anti-Fas M-20 antibody with the antigenic peptide (preabsorbed antibody) resulted in the blockade of the immunoreaction of these Fas forms (Fig. 1), as it was also the case for native (35 kDa) and glycosylated (45–52 kDa) Fas (see García-Fuster et al., 2003).

3.2. Effects of NEM on the immunodensities of Fas aggregates and native and glycosylated Fas

In order to determine whether the cysteine residues on Fas play a role in Fas aggregation and to assess the relation between high molecular mass Fas aggregates and other Fas-related proteins (native and glycosylated Fas), the sulfhydryl alkylating reagent NEM was used as a tool to dissociate Fas aggregates. Preincubation of rat cerebral cortical membranes with NEM (1 mM for 1 h at 37 °C) significantly reduced the immunodensity of ~ 203 kDa Fas aggregates (51 ± 4%, $n=6$, $P<0.001$) but not that of ~ 110/120-kDa aggregates (Fig. 2). Concomitantly, NEM markedly increased the densities of 35-kDa native Fas (172 ± 10%, $n=6$, $P<0.0001$) and 51/48-kDa glycosylated Fas (47 ± 6%, $n=6$, $P<0.0001$; Fig. 2). Similar effects were observed

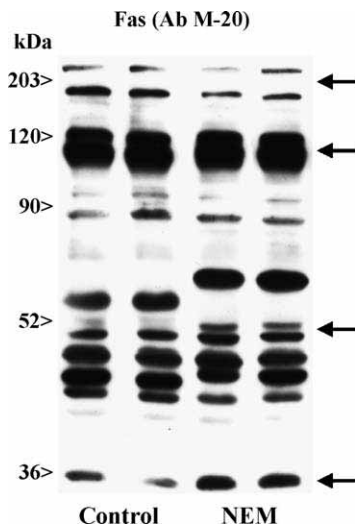


Fig. 2. Effect of *N*-ethylmaleimide (NEM, 1 mM for 1 h at 37 °C) on the immunodensities of Fas aggregates (~ 203- and ~ 110/120-kDa peptides), glycosylated Fas (48- and 51-kDa peptides) and native Fas (35-kDa peptide) detected with anti-Fas M-20 antibody (batch F251) in rat cortical membranes. The apparent molecular masses of Fas-related proteins (arrows) were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left-hand side. An appropriate film time exposure (15 min) allowed the simultaneous visualization and quantitation of the various forms of Fas in the same blot (203-, 110/120-, 48/51-kDa peptides were quantitated as doublets, see arrow position). In less-exposed films (3 min), no modulation by NEM on ~ 110/120-kDa Fas aggregates was observed (see Results). Note that batch F251 for antibody M-20 detected Fas-related peptides of ~ 44/46 kDa that were not immunodetected with batch D219 (see Fig. 4; see also García-Fuster et al., 2003 for other details on these Fas-related proteins). The experiment shown in this figure was repeated three times with very similar results.

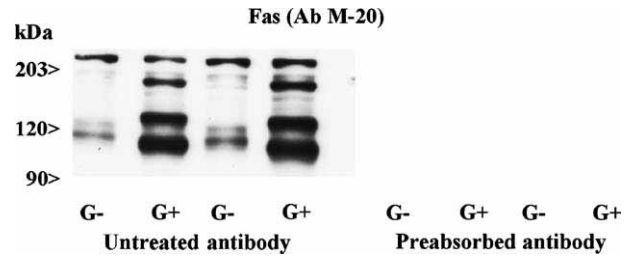


Fig. 3. Effect of enzymatic *N*-deglycosylation (*N*-glycosidase F for 3 h at 37 °C) on the immunodensities of Fas aggregates (~ 203- and ~ 110/120-kDa peptides) detected with anti-Fas M-20 antibody in rat cortical membranes. The samples [18 µg protein (lines 1–2 and 5–6) and 36 µg protein (lines 3–4 and 7–8)] were incubated in the absence (G–) or presence (G+) of the *N*-glycosidase F (15 units). Other details are the same as for Fig. 1 (preabsorbed antibody) and Fig. 2 (203- and 110/120-kDa peptides were quantitated as doublets). The apparent molecular masses of Fas aggregates were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left-hand side. The experiment shown in this figure was repeated three times with very similar results.

with the parent compound NMM (data not shown). These data indicated that disulfide bonds are involved in Fas dimerization in brain tissue.

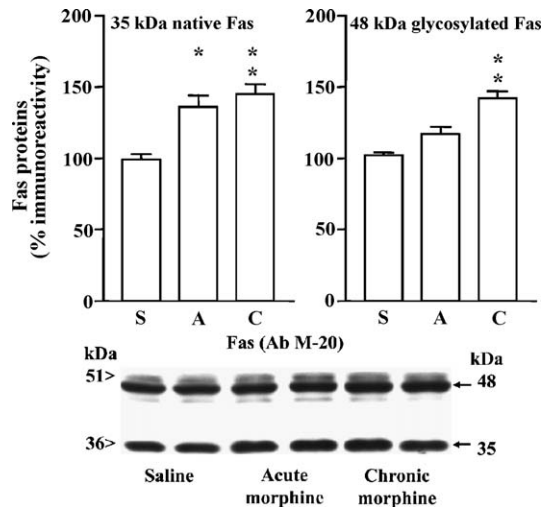


Fig. 4. Effects of acute and chronic treatments with morphine on the immunodensities of native Fas (35-kDa peptide) and glycosylated Fas (48-kDa peptide), detected with anti-Fas M-20 antibody, in the rat brain (cerebral cortex). Groups of treatments: saline (S), acute morphine (A, 30 mg/kg i.p., 2 h) and chronic morphine (C, 10–100 mg/kg i.p. for 5 days). Columns are means ± S.E.M. of four experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected significant differences between groups with respect to native Fas [$F(2,9)=12.4$, $P=0.004$] and glycosylated Fas [$F(2,9)=24.5$, $P=0.0004$]. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ when compared with the corresponding saline group (ANOVA followed by Bonferroni's test). Bottom: representative immunoblot for the effects of morphine treatments (two animals for each group, 40 µg protein) on the immunodensity of native and glycosylated Fas (arrows) in the rat cerebral cortex (all samples were run in the same gel). The apparent molecular masses of Fas proteins were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left-hand side.

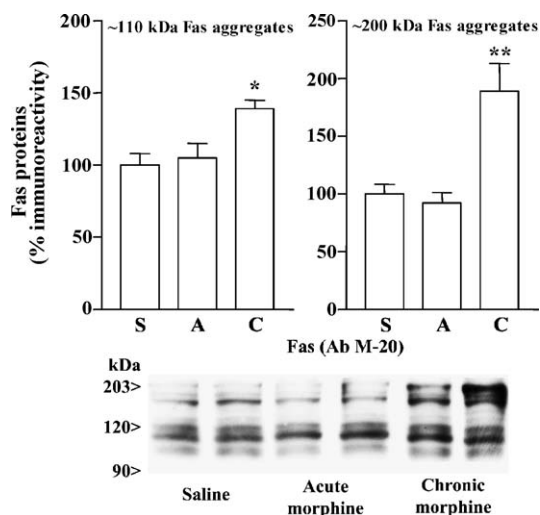


Fig. 5. Effects of acute and chronic treatments with morphine on the immunodensities of Fas aggregates ($\sim 110/120$ - and ~ 203 -kDa peptides), detected with anti-Fas M-20 antibody, in the rat brain (cerebral cortex). Groups of treatments: saline (S), acute morphine (A, 30 mg/kg i.p., 2 h) and chronic morphine (C, 10–100 mg/kg i.p. for 5 days). Columns are means \pm S.E.M. of four experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected significant differences between groups with respect to $\sim 110/120$ -kDa Fas [$F(2,9)=8.2$, $P=0.012$] and ~ 203 -kDa Fas [$F(2,9)=11.8$, $P=0.0031$]. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ when compared with the corresponding saline group (ANOVA followed by Bonferroni's test). Bottom: representative immunoblot (upper part of the immunoblot shown in Fig. 4) for the effects of morphine treatments (two animals for each group, 40 μ g protein) on the immunodensity of Fas aggregates in the rat cerebral cortex (all samples were run in the same gel). Other details are the same as for Fig. 3 (203- and 110/120-kDa peptides were quantitated as doublets). The apparent molecular masses of Fas aggregates were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left-hand side.

3.3. Changes in the immunodensity of Fas aggregates after Fas receptor deglycosylation

In the rat cerebral cortex, enzymatic *N*-deglycosylation of Fas receptor was previously shown to induce a marked increase in the expression of 35-kDa native Fas and related peptides ($\sim 43/45$ kDa), which were immunodetected with the anti-Fas M-20 antibody (García-Fuster et al., 2003). In rat brain tissue, enzymatic *N*-deglycosylation of Fas receptor (*N*-glycosidase F, 15 units for 3 h at 37 °C), followed by immunoblotting with anti-Fas C-20 antibody that only recognizes 51-kDa glycosylated Fas (García-Fuster et al., 2003), also resulted in the appearance of a related peptide of lower molecular mass (~ 45 kDa) which was not immunodetected with the preabsorbed antibody (data not shown).

In membranes from rat cerebral cortex, enzymatic *N*-deglycosylation of Fas receptor markedly increased the immunodensity of Fas aggregates ($\sim 110/120$ -kDa aggregates: five- to sixfold, $n=4$, $P<0.0001$, and ~ 203 -kDa aggregates: two- to threefold, $n=4$, $P<0.0005$; Fig. 3). Again, these forms of high molecular mass Fas aggregates

and their up-regulations following receptor deglycosylation were not visualized with the preabsorbed anti-Fas M-20 antibody (Fig. 3).

3.4. Effects of opiate drugs on Fas receptor and Fas aggregates in rat brain

The acute (30 mg/kg for 2 h) and chronic (10–100 mg/kg for 5 days) treatments with morphine, a μ -opioid peptide receptor agonist, increased the immunodensities of 35-kDa native Fas (36–45%, $n=4$, $P<0.01$) and 48-kDa glycosylated Fas (17–42%, $n=4$, $P<0.001$) in the rat cerebral cortex (Fig. 4). In the same rat brain samples (and same immunoblots), chronic morphine treatment was also associated with a significant up-regulation in the immunodensity of Fas aggregates ($\sim 110/120$ -kDa aggregates: 39%, $n=4$, $P<0.05$, and ~ 203 -kDa aggregates: 89%, $n=4$, $P<0.01$; Fig. 5). In contrast, acute morphine treatment did not alter the content of high molecular mass Fas aggregates in the brain (Fig. 5).

The acute treatment (10 mg/kg for 2 h) with SNC-80 (a selective δ -opioid peptide receptor agonist) modestly, but significantly, decreased the immunodensity of Fas aggregates (15%, $P<0.02$) in the rat brain (Table 1). The acute treatment (10 mg/kg for 2 h) with U 50488-H (a selective κ -opioid peptide receptor agonist), and the acute (5 mg/kg for 2 h) and chronic (3–10 mg/kg for 3 days) treatments with (+)-SKF10047 (a potent σ_1 -receptor agonist) did not modify significantly the immunodensity of Fas aggregates in the rat cerebral cortex (Table 1).

Table 1
Effects of opiate drugs on the immunodensity of Fas receptor aggregates in rat brain

Treatment (time)	Dose (mg/kg)	Fas aggregates % immunoreactivity	<i>n</i>
DMSO (2 h)	–	101 \pm 3	6
Acute SNC-80 (2 h)	10	86 \pm 4*	8
Saline (2 h)	–	99 \pm 3	5
Acute U 50488-H (2 h)	10	100 \pm 5	4
Saline (2 h)	–	100 \pm 4	4
Acute (+)-SKF10047 (2 h)	5	98 \pm 1	4
Saline (3 days)	–	98 \pm 3	5
Chronic (+)-SKF10047 (3 days)	3–10	90 \pm 5	5

Rats were treated with SNC-80 (a selective δ -opioid peptide receptor agonist), U 50488-H (a selective κ -opioid peptide receptor agonist) and (+)-SKF10047 (a potent σ_1 -receptor agonist and a mixed δ/κ -opioid peptide receptor agonist and μ -opioid peptide receptor antagonist), and the immunodensity of Fas aggregates ($\sim 110/120$ kDa) was quantitated (SDS-PAGE; anti-Fas M-20 antibody) in the cerebral cortex. See Materials and methods for further experimental details. Each value represents the mean \pm S.E.M. (expressed as percentage of the corresponding control group) of *n* experiments per group with one animal per experiment.

* $P<0.02$ when compared with its control group (Student's *t*-test).

4. Discussion

The immunodetection of high molecular mass Fas receptor aggregates ($\sim 110/120$ - and ~ 203 -kDa peptides) with anti-Fas M-20 antibody in rat, mouse and human brains, as well as in SH-SY5Y neuroblastoma cells, was in general agreement with previous findings revealing similar forms of Fas aggregates (stable in SDS and β -mercaptoethanol) in various cell lines (Kischkel et al., 1995; Kamitani et al., 1997; Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000a). These studies (Kamitani et al., 1997; Papoff et al., 1999) demonstrated that cross-linking of Fas with a chemical agent or an agonistic antibody induced the formation of Fas aggregates (i.e., complexes of intact Fas monomers of 120, 180 and/or ~ 206 kDa), which were immunodetected with antibodies also directed against the cytoplasmic domain of Fas. These Fas aggregates could correspond to dimeric or trimeric receptors, or even higher-order receptor aggregates (oligomerization forms of Fas; Papoff et al., 1999; Algeciras-Schimmich et al., 2002). Several studies have also reported the immunodetection of dimers and oligomers for other receptors, following receptor solubilization and resolution by denaturing SDS-PAGE, demonstrating that these receptor species are not the result of spurious disulfide bonding during tissue preparation (Ng et al., 1996; Cvejic and Devi, 1997; Lee et al., 2003; Salahpour et al., 2003). Moreover, the dissociation of oligomeric species of β_2 -adrenoceptors was accompanied by an increase in the content of monomeric forms (Salahpour et al., 2003). In rat brain membranes, the current results demonstrate that NEM (a sulfhydryl alkylating reagent) reduced the immunodensity of ~ 203 -kDa Fas aggregates with a concomitant marked increase in the densities of 35-kDa native Fas and 51/48-kDa glycosylated Fas, indicating a clear relation between Fas aggregates (disulfide bridges would be required for the stability of Fas oligomers) and Fas monomeric forms in brain tissue. Therefore, the current findings demonstrate that high molecular mass Fas aggregates are expressed natively in the brain of mammals and that these Fas forms (receptor oligomerization) can be detected by Western blot analysis under denaturing conditions. These Fas aggregates appear to be the initial signaling form of Fas (Algeciras-Schimmich et al., 2002).

Glycosylation is one of the most common posttranslational modifications of receptor proteins and these attached glycans are relevant for ligand receptor binding and cell signaling, as is the case for Fas that possesses two putative *N*-glycosylation sites at N22 and N93 (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992; Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Kamitani et al., 1997). Notably, the enzymatic *N*-deglycosylation of Fas receptor markedly increased the immunodensity of high molecular mass Fas aggregates ($\sim 110/120$ -kDa Fas: five- to sixfold, and ~ 203 -kDa Fas: two- to threefold) in the rat cerebral cortex. In this context, α_2A/β_1 -adrenoceptor heterodimerization in heterologous cellular systems was shown to be enhanced by point mutations in either receptor

(N10A, N15A) that blocked *N*-linked glycosylation, indicating that the interaction between these two adrenoceptors is regulated by glycosylation (Xu et al., 2003). In this study, it was suggested that lack of glycosylation alters the conformations of both adrenoceptors such that the efficiency of their heterodimerization is increased (Xu et al., 2003). Moreover, the enhanced heterodimerization of the mutant adrenoceptors was functionally relevant, because it modulated receptor internalization and altered the pharmacological properties of one of the receptors (Xu et al., 2003). In a previous study by the same group (He et al., 2002), it was shown that blocking β_1 -adrenoceptor *N*-linked glycosylation (N15A) reduced β_1 -adrenoceptor homodimerization. It is known, however, that the functional effects of *N*-glycosylation on receptors are highly variable (see He et al., 2002 for discussion). The current results clearly indicate that the native expression of Fas receptor homodimerization in the brain was markedly increased after receptor deglycosylation, and, therefore, Fas glycosylation must play a role in regulating receptor dimerization. Because these Fas aggregates have been shown to be one of the earliest events in Fas signaling (Algeciras-Schimmich et al., 2002), drug modulation (e.g., opiate drugs) of these forms of Fas appeared of relevance.

Another major finding of the present study is that chronic, but not acute, morphine administration (opiate tolerance and dependence induced by the μ -opioid peptide receptor agonist; García-Fuster et al., 2003) was associated with up-regulation of high molecular mass Fas aggregates ($\sim 110/120$ and ~ 203 kDa) in the rat cerebral cortex. As expected (García-Fuster et al., 2003), the immunodensity of native (35 kDa) and glycosylated (48 kDa) Fas were increased by acute and chronic morphine treatments. Moreover, the acute and/or chronic treatments with selective δ - (SNC-80) and κ - (U 50488-H) opioid peptide receptor agonists, and a σ_1 -receptor agonist (SKF10047) did not readily alter the content of Fas aggregates in rat brain (SNC-80 induced a modest decrease). In a previous study (García-Fuster et al., 2003), these δ - and κ -opioid peptide receptor agonists did not modulate native or glycosylated Fas, but acute and chronic treatments with the σ_1 -receptor agonist (SKF 10047 is also a mixed δ/κ -opioid peptide receptor agonist) induced a down-regulation of these Fas forms in the brain. Taken together, these results clearly indicate that opiate tolerance and dependence in rats, mediated through the sustained stimulation of μ -opioid peptide receptors, result in up-regulation of high molecular mass Fas aggregates in the brain. Therefore, these processes not only are associated with increased immunodensities of native Fas and glycosylated Fas (Boronat et al., 2001; García-Fuster et al., 2003) but also with an up-regulation of Fas aggregates (present results), which appear to trigger Fas signaling (Algeciras-Schimmich et al., 2002). At present, the functional implications of the up-regulation of Fas in morphine-treated rats (abnormal cell death and/or non-apoptotic cell signaling) are not precisely known (see

García-Fuster et al., 2003 for further discussion on this topic).

In summary, high molecular mass Fas aggregates are expressed natively in rat, mouse and human brain membranes, and its density is regulated by the state of Fas glycosylation. Moreover, these forms of Fas (receptor homodimerization) appear to be functionally relevant because they were up-regulated (together with native and glycosylated Fas) in the brain of morphine-dependent rats.

Acknowledgements

This study was supported by grants BFI2000-0306 and SAF2004-3685 from MCT (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, Spain) and by grant 32.57066.99 from FNSRS (Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique, Bern, Switzerland). M.J.G.-F. was supported by a predoctoral fellowship from CSIC/MECD-Associated Units. J.A. García-Sevilla is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Spain).

References

- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B.C., Murmann, A.E., Burkhardt, J.K., Peter, M.E., 2002. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell. Biol.* 22, 207–220.
- Badorff, C., Ruetten, H., Mueller, S., Stahmer, M., Gehring, D., Jung, F., Ihling, C., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2002. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase β and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J. Clin. Invest.* 109, 373–381.
- Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., Naftolin, F., 1999. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain. *Glia* 27, 62–74.
- Boronat, M.A., García-Fuster, M.J., García-Sevilla, J.A., 2001. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 134, 1263–1270.
- Choi, C., Park, J.Y., Lee, J., Lim, J.-H., Shin, E.-C., Ahn, Y., Kim, C.-H., Kim, S.-J., Kim, J.-D., Choi, I.S., Choi, I.-H., 1999. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- α , or IFN- γ . *J. Immunol.* 162, 1889–1895.
- Cvejić, S., Devi, L., 1997. Dimerization of the δ -opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 272, 26959–26964.
- Desbarats, J., Birge, R.B., Minouni-Rongy, M., Weistein, D.E., Palerm, J.-S., Newell, M.K., 2003. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nature Cell Biology* 5, 118–125.
- García-Fuster, M.J., Ferrer-Alcón, M., Miralles, A., García-Sevilla, J.A., 2003. Modulation of Fas receptor proteins and dynamin during opiate addiction and induction of opiate withdrawal in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 368, 421–431.
- He, J., Xu, J., Castleberry, A.M., Lau, A.G., Hall, R.A., 2002. Glycosylation of β_1 -adrenergic receptors regulates receptor surface expression and dimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 565–572.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S.-I., Samehima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S., 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233–243.
- Kamitani, T., Nguyen, H.P., Yeh, E.T.H., 1997. Activation-induced aggregation and processing of the human fas antigen. Detection with cytoplasmic domain-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 272, 22307–22314.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.
- Krammer, P.H., 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789–795.
- Lee, S.P., O'Dowd, B.F., Rajaram, R.D., Nguyen, T., George, S.R., 2003. D2 Dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4. *Biochemistry* 42, 11023–11031.
- Nagata, S., 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33, 29–55.
- Ng, G.Y.K., O'Dowd, B.F., Lee, S.P., Chung, H.T., Brann, M.R., Seeman, P., George, S.R., 1996. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 200–204.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B., Ponsingl, H., Krammer, P., 1992. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family. *J. Biol. Chem.* 267, 10709–10715.
- Ozaita, A., Escrivá, P.V., García-Sevilla, J.A., 1999. The alkylating agent EEDQ facilitates protease-mediated degradation of the human brain α_2A -adrenoceptor as revealed by a sequence-specific antibody. *Neurosci. Lett.* 263, 105–108.
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M.A., Di Leve, G., Signore, A., Ruberti, G., 1999. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 38241–38250.
- Raoul, C., Estévez, A.G., Nishimune, H., Cleveland, D.W., deLapeyrière, O., Henderson, C.E., Haase, G., Pettmann, B., 2002. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas: potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35, 1067–1083.
- Salahpour, A., Bonin, H., Bhalla, S., Petäjä-Repo, U., Bouvier, M., 2003. Biochemical characterization of β_2 -adrenergic receptor dimers and oligomers. *Biol. Chem.* 384, 117–123.
- Sastry, P.S., Rao, K.S., 2000. Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74, 1–20.
- Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Ka-Ming Chang, F., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y., Lenardo, M.J., 2000a. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354–2357.
- Siegel, R.M., Ka-Ming Chang, F., Chun, H.J., Lenardo, M.J., 2000b. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 1, 469–474.
- Tada, Y., Wang, J., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Kuriyama, T., Okada, S., Tokuhisa, T., Sakiyama, S., Tagawa, M., 2002. A novel role for Fas ligand in facilitating antigen acquisition by dendritic cells. *J. Immunol.* 169, 2241–2245.
- Wajant, H., 2002. The Fas signalling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635–1636.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Nagata, S., 1992. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J. Immunol.* 148, 1274–1279.
- Xu, J., He, J., Castleberry, A.M., Balasubramanian, S., Lau, A.G., Hall, R.A., 2003. Heterodimerization of α_2A - and β_1 -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 10770–10777.
- Yu, V.C., Richards, M.L., Sadée, W., 1986. A human neuroblastoma cell line expresses μ and δ opioid receptor sites. *J. Biol. Chem.* 261, 1065–1070.
- Yuan, J., Yankner, B.A., 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802–809.

ARTÍCULO IV

ARTÍCULO IV

Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: Regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway.

M. Julia García-Fuster, Antonio Miralles, Jesús A. García-Sevilla.

En revisión editorial (junio, 2005).

Para completar el estudio de la vía apoptótica extrínseca mediada por Fas en la adicción a opiáceos, se prestó particular atención a la proteína FADD, el factor que acopla Fas a la procaspasa-8 y transmite la señal de muerte celular. Así, en este trabajo se cuantificaron los efectos mediados por receptores opioides (agonistas μ -, δ -, y κ -opioides, y sus respectivos antagonistas; efectos agudos, crónicos y procesos de abstinencia) sobre la proteína FADD, y sobre las caspasas efectoras 8 y 3 en cerebro de rata. Los principales resultados indicaron, en primer lugar, que los tratamientos agudos con los agonistas μ - (sufentanilo, morfina), δ - (SNC-80) y κ -opioides (U50488H) indujeron disminuciones del contenido de FADD en cerebro tras la activación del correspondiente receptor opioide. En segundo lugar, cabe destacar que la administración repetida de fármacos opiáceos resultó en la inducción de tolerancia a sus efectos agudos inhibitorios sobre el FADD. Por último, la abstinencia en ratas tolerantes a agonistas μ - y δ -opiáceos también se asoció con una disminución en la densidad de FADD. También es de interés señalar que un inhibidor selectivo de la quinasa MEK1/2 (SL 327) previno la disminución inducida sobre el FADD por el SNC-80 (agonista δ), lo que demostró la participación de la activación ERK1/2 en la regulación *in vivo* del FADD por fármacos opiáceos.

La adicción a heroína/morfina y la abstinencia a opiáceos en ratas se asoció con incrementos en las proteínas Fas (receptor nativo y complejos de monómeros relevantes en la señalización de Fas) en cerebro (artículos precedentes). Sin embargo, la proteína FADD, que acopla el receptor Fas con la caspasa-8 y que transmite la señal de muerte, siguió una modulación opuesta. En conjunto, estos resultados sugieren que las posibles señales apoptóticas iniciadas tras la activación de Fas por opiáceos serían anuladas por una disminución en la transducción de la señal a través del FADD y las caspasas efectoras-8 y 3 (que no se encontraron alteradas por ningún tratamiento opiáceo).

En revisió editorial
(junio 2005)

Effects of Opiate Drugs on Fas-Associated Protein with Death Domain (FADD) and Effector Caspases in the Rat Brain: Regulation by the ERK1/2 MAP Kinase Pathway

M. Julia García-Fuster MSc, Antoni Miralles PhD, and Jesús A. García-Sevilla MD PhD*

Laboratori de Neurofarmacologia, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Spain

Running title: Regulation of FADD by opiate drugs.

Abbreviations used: APO-1 or Fas, apoptosis-1 protein; DISC, death-inducing signaling complex; DMSO, dimethyl sulfoxide; ECL, enhanced chemiluminescence; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FADD, Fas-associated protein with death domain; IOD, integrated optical density; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase and ERK kinase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

***Correspondence:** JA García-Sevilla, Laboratory of Neuropharmacology, IUNICS, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Spain, Tel: +34-971 173148, Fax: +34-971 173184, E-mail: jesus.garcia-sevilla@uib.es

Abstract

Opiate addiction is associated with up-regulation of Fas, a receptor that can promote apoptosis in the brain. This study was designed to quantitate FADD, the protein transmitting the death signal, and effector caspases in the rat brain during the processes of opiate tolerance and dependence. Acute treatments with high (extra-analgesic) doses of sufentanil and morphine (μ -agonists), SNC-80 (δ -agonist) and U50488H (κ -agonist) induced significant decreases (30-60%) in FADD immunodensity in the cerebral cortex, through specific opioid receptor mechanisms (effects antagonized by naloxone, naltrindole or nor-binaltorphimine). Chronic (5 days) morphine (10-100 mg/kg), SNC-80 (10 mg/kg) or U50488H (10 mg/kg) was associated with the induction of tolerance to the acute effects. In morphine- and SNC-80-tolerant rats, antagonist-precipitated (2 h) or spontaneous withdrawal (24-48 h) induced a new and sustained inhibition of FADD (13-50%). None of these treatments altered the densities of caspases-8/3 in the brain. Pretreatment of rats with SL 327 (a selective MEK1/2 inhibitor which blocks ERK1/2 activation) fully prevented the down-regulation of FADD induced by SNC-80 in the cerebral cortex (43%) and corpus striatum (29%), demonstrating the direct involvement of ERK1/2 signaling in the regulation of FADD by the opiate. The results indicate that μ - and δ -opioid receptors have a prominent role in the modulation of FADD (opposite to that of Fas) during the process of opiate addiction. Opiate drugs (and specifically the δ -agonists) could promote survival signals in the brain through inhibition of FADD, which in turn is dependent on the activation of the anti-apoptotic ERK1/2 signaling pathway.

Keywords: FADD; caspases 8/3; opiate agonists and antagonists, opiate addiction; ERK1/2; MEK inhibition (SL 327); rat brain

INTRODUCTION

Fas (APO-1) is a cell surface receptor glycoprotein belonging to the tumor necrosis/nerve growth factor superfamily (Nagata and Golstein, 1995), which plays a major role in apoptosis (MacEwan, 2002). Following trimerization of Fas after ligation with Fas-L, the receptor rapidly recruits procaspase-8 through the key adaptor protein called FADD (Fas-associated protein with death domain) (Chinnaiyan et al., 1995) that transmits the death signal (Algeciras-Schimmich et al., 2002; Henkler et al., 2005). FADD protein carries a death domain (DD) at its C-terminal region, involved in the binding of Fas, which also displays a single serine phosphorylation site that is essential, *inter alia*, for cell cycle regulation and survival/proliferation in some cells (Scaffidi et al., 2000; Zhang et al., 2004). The N-terminal domain of FADD is called the death effector domain (DED) and is responsible for recruiting procaspase-8, which after dimerization is autoactivated to a mature enzyme with the initiation of apoptosis (Tourneur et al., 2005). FADD is expressed in the cytoplasm and nucleus (Gómez-Angelats and Cidlowski, 2003), but upon Fas ligation cytoplasmic FADD is rapidly recruited to the plasma membrane where it forms, together with Fas and procaspase-8, the so-called death-inducing signaling complex (DISC) (Kischkel et al., 1995; Algeciras-Schimmich et al., 2002). In type I cells (not dependent on mitochondrial signal amplification) (Barnhart et al., 2003), caspase-8 directly activates downstream effector caspases (e.g. caspases-3/6/7) allowing cleavage of numerous substrates leading to cell death (Cohen, 1997; MacEwan, 2002). Fas-induced death in the nervous system (Felderhoff-Mueser et al., 2000) was shown to share the same basic mechanisms with peripheral cells (Sastry and Rao, 2000).

Besides the role of Fas/FADD in apoptosis, there are now solid evidences that also demonstrate the relevance of this system in the regulation of cell growth and

differentiation (Budd, 2002; Tibbetts et al., 2003) and in regenerative responses in neurons (Desbarats et al. 2003; Lambert et al., 2003). These non-apoptotic roles for Fas/FADD are still poorly understood and may involve the activation of the ERK1/2 MAP kinase pathway, which is important for anti-apoptotic signals (Holmström et al., 1999, 2000; Wada and Penninger, 2004) and for the regulation of synaptic plasticity, learning and memory (Kyosseva, 2004).

During the last few years, various chronic effects of heroin/morphine on the structure of neurons have been interpreted to indicate that opiate drugs might induce neuronal damage after long-term exposure (see Nestler, 1996; Büttner et al., 2000; Ferrer-Alcón et al., 2000). In this context, Fas proteins (native and glycosylated receptor, and complexes of monomers relevant in Fas signalling) were shown to be up-regulated after chronic heroin and morphine treatments and heroin withdrawal in rat brain (Boronat et al., 2001; García-Fuster et al., 2003a, 2004a), suggesting a role for Fas in opiate addiction either as promoter of abnormal cell death (see Yin et al., 1999; Wang et al., 2002) or as a possible non-apoptotic signal transducer of opioid receptors (see Tegeger and Geisslinger, 2004). To clarify this issue, the present study was designed to assess the modulation of FADD (transmitter of the Fas signal) and effector caspases-8/3 in the brain after the acute and chronic treatments with selective μ -, δ - and κ -opioid peptide (MOP-, DOP-, KOP-) receptor agonists, and during the induction of opiate withdrawal in rats. The involvement of ERK1/2 signalling in the effect of a δ -agonist on FADD was also investigated. A preliminary account of this work was given at the XXV Congress of the Spanish Society of Pharmacology (García-Fuster et al., 2003b).

MATERIALS AND METHODS

Opiate Drug Treatment of Rats

Adult male Sprague-Dawley rats (200-250 g) were used. They were housed under controlled environmental conditions (22°C, 70% humidity, and 12-h light/dark cycle) with free access to a standard diet and tap water. The rats were treated in accordance with the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (1985) and in agreement with the local ethical committee. For the acute treatments with opiate agonists, the rats received a single intraperitoneal (i.p.) or subcutaneous (s.c.) injection of sufentanil (1-30 µg/kg, s.c., 30 min; or 15 µg/kg for 30-120 min), morphine (3-100 mg/kg, i.p., 2 h), SNC-80 (a selective δ-agonist, 1-10 mg/kg, i.p., 30 min; or 10 mg/kg for 30-120 min) or (-)-U50488H (a selective κ-agonist, 1-10 mg/kg, i.p., 1 h; or 10 mg/kg for 30-120 min). To assess the specificity of the opioid receptor involved, groups of rats received single doses of the non-selective antagonist naloxone (10 mg/kg, i.p.) alone (90 min) or 60 min before sufentanil (15 µg/kg), the selective δ-antagonist naltrindole (5 mg/kg, i.p.) alone (60 min) or 30 min before SNC-80 (10 mg/kg) and the selective κ-antagonist nor-binaltorphimine (5 mg/kg, i.p.) alone (90 min) or 30 min before (-)-U50488H (10 mg/kg). Control rats received 0.9% saline vehicle (1 ml/kg) or DMSO (dimethyl sulphoxide, 1 ml/kg, in the case of SNC-80). The animals were killed by decapitation at the indicated times. For the chronic treatment with morphine, the rats were injected i.p. three times daily during 5 days with increasing doses of the opiate (10-100 mg/kg) (Boronat et al., 2001) and sacrificed 2 h after the last dose. After this chronic treatment, naloxone (2 mg/kg, i.p., 2 h)-precipitated withdrawal or spontaneous (24 and 48 h) opiate withdrawal was induced, which resulted in the standard behavioral reaction (data not shown; see Gabilondo and García-Sevilla, 1995; Miralles et al., 2005). In another series of chronic experiments, groups of rats were treated with SNC-80 (10 mg/kg) or (-)-U50488H (10 mg/kg) once daily during 5 days. After these chronic treatments, naltrindole or nor-binaltorphimine (5 mg/kg, i.p., 2 h)-precipitated opiate

withdrawal was induced, which resulted in a mild behavioral (κ) reaction or the absence of behavioral (δ) signs (data not shown; see Milanés and Laorden, 1998; Brandt et al., 2001). Control rats received chronic 0.9% saline (1 ml/kg) or DMSO (1 ml/kg, in the case of SNC-80) in parallel. The animals were sacrificed 30 min-2 h after the last dose (chronic saline, chronic opiate or chronic opiate plus withdrawal) or at the times indicated after morphine withdrawal. The brains were rapidly removed and specimens of the cerebral cortex and/or corpus striatum were dissected on ice, frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C until use.

In Vivo effect of MEK Inhibition on δ -Opioid Receptor-Mediated Changes in FADD and MEK/ERK activities

To assess the possible involvement of MAPK/ERK1/2 in the regulation of FADD by the δ -agonist SNC-80, groups of rats were treated with the highly selective MAP/ERK kinases (MEK1/2) inhibitor SL 327 (Scherle et al., 2000) (20 mg/kg, i.p.) alone (90 min) or 60 min before SNC-80 (10 mg/kg, 30 min) to block ERK1/2 activation. Control rats received DMSO (1 ml/kg) or SNC-80 (10 mg/kg, i.p., 30 min). The animals were sacrificed at the indicated times and the immunodensity of FADD quantitated. In this series of experiments, the effects of SNC-80, SL 327 and SNC+SL on the contents of MEK/ERK, Fas receptor proteins and β -actin were also quantitated (see below). In the MEK/ERK1/2 activation assays equal amounts of protein were used to visualize and quantify phosphorylation of MEK1/2 and ERK1/2 (p44/42 MAP kinases) by immunoblotting essentially as described (Ferrer-Alcón et al., 2004).

Sample Preparations and Dephosphorylation and Subcellular Fractionation Experiments

Brain tissue was homogenized (1:15, wt/vol) in cold 50 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 2% SDS, 1 mM EDTA, and various protease inhibitors (García-Fuster et al., 2003a). Aliquots of total homogenate were mixed with equal volumes of electrophoresis loading buffer, boiled (denatured) and stored at -20°C until use. Protein concentrations were determined by the BCA Protein Assay Reagent (Pierce Biotechnology). In addition to rat brain, mouse (cerebral cortex) and human (prefrontal cortex) brain samples were also used for the immunodetection and characterization of FADD with different anti-FADD antibodies. In some experiments, the specificity of the anti-FADD antibody (H-181) for nonphosphorylated or phosphorylated epitopes was tested on Western blots of rat brain, essentially as described (Ferrer-Alcón et al. 2000). Briefly, brain tissue was homogenized (as above without EDTA) and centrifuged ($40,000 \times g$ for 15 min). Aliquots of the initial homogenate and the final supernatant were incubated in the absence (control) or presence of calf intestinal mucosa alkaline phosphatase (95 units, Product 79390, Sigma-Aldrich, Germany). Some samples containing the enzyme were also incubated with 100 mM sodium pirophosphate (inhibited control). The reaction was terminated by adding 100 mM sodium pirophosphate to control and alkaline phosphatase samples. Finally the samples were prepared (about 40 μg protein) for SDS-PAGE (see below). In other experiments the subcellular localization of FADD was assessed according to standard methods. In brief, cortical samples were homogenized in 0.32 M sucrose buffer (pH 7.5) containing a protease inhibitor cocktail as above. The homogenate was centrifuged at $1,150 \times g$ for 10 min to precipitate nuclei and the sediment washed and recentrifuged. Then the crude nuclear pellet was purified (2.39 M sucrose), centrifuged ($48,000 \times g$ for 45 min), resuspended in buffer without sucrose (nuclear fraction, N) and stored at -80°C . The first supernatant was centrifuged at $21,000 \times g$ for 20 min., and the resultant soluble supernatant (cytosolic fraction, S2) and the

resuspended pellet (membrane fraction, P2) were stored as above until use. Samples of membrane, cytosolic and nuclear fractions were assayed for FADD content by Western blotting as described below.

Immunoblot Assays and Quantitation of Target Proteins

In routine experiments, 40 μ g protein of each rat brain sample was subjected to SDS-PAGE on 10% (FADD) or 15% (caspases) polyacrylamide minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and incubated in a blocking solution (García-Fuster et al., 2003a). The membranes were incubated overnight at 4°C in blocking solution containing the appropriate primary antibody: anti-FADD (H-181) (affinity-purified rabbit polyclonal antibody raised against human FADD C-terminal 28-208 residues; dilution 1:5000; sc-5559, batch C-112, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-FADD (N-18) (affinity-purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping at the N-terminal of human FADD; dilution 1:1000; sc-1172, batch H-231, Santa Cruz); anti-caspase-8 p20 (rabbit polyclonal antibody raised against human caspase-8, residues 217-350, that also reacts with the p20 cleavage form; dilution 1:1000; sc-7890, batch F-1604, Santa Cruz), anti-caspase-3 (rabbit polyclonal antibody raised against the full-length precursor form of human caspase-3, residues 1-277, that also reacts with the p20 cleavage form; dilution 1:2000; sc-7148, batch H-011, Santa Cruz), and anti- β -actin (mouse monoclonal antibody raised against a peptide mapping the N-terminal of β -actin of mouse origin; dilution 1:10,000; clone AC-15; batch No. 014K4840, Sigma Chemical Co., MO, USA). In order to test the selectivity of anti-FADD antibodies (H-181 and N-18) with specific proteins, the antigenic peptides (sc-4701 and sc-1172P, Santa Cruz) were preincubated in excess with the antisera to block

the binding of the antibody to the specific protein species tested. Other primary antibodies used were: anti-Fas M-20 (Santa Cruz); anti-total and anti-phosphorylated MEK1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), and anti-total and anti-phosphorylated ERK1/2 (Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, CA, USA) (see García-Fuster et al., 2003a; Ferrer-Alcón et al., 2004). The secondary antibody, horseradish peroxidase-linked anti-rabbit or anti-mouse IgG, was incubated at 1:5000 dilution in blocking solution at room temperature for 1 h, or during 45 min for the anti-goat IgG. Immunoreactivity of target proteins was detected with the Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blot Detection system (Amersham International, Buckinghamshire, UK) and visualized by exposure to Hyperfilm ECL film (Amersham) for 30 s to 60 min (autoradiograms). The autoradiograms were quantitated by densitometric scanning (GS-800 Imaging Densitometer, Bio-Rad). The amount of target proteins in brain samples of rats treated with opiate drugs was compared in the same gel with that of control rats which received saline or DMSO solution. Experiments were performed by using protein samples known to be within the linear range for immunolabeling of FADD and other target proteins (see Boronat et al. 2001). The quantification procedure was assessed 3-5 times in different gels (each gel with different brain samples from saline/DMSO- and drug-treated rats). Finally, percent changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each rat treated with the specific drug in the various gels and the mean value used as a final estimate. In all experiments, the content of β -actin (a cytoskeletal protein not altered by opiate treatment; Ammon et al., 2003; Marie-Claire et al., 2004) was quantitated as a negative control.

Data analyses and statistics

All series of data were analyzed with the program GraphPad PrismTM, version 3.0. Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, and Student's two-tailed *t*-test were used for the statistical evaluations. The level of significance was chosen as $p = 0.05$.

Drugs and chemicals

Opiate drugs (and their sources) included sufentanil HCl (Janssen-Cilag, S.A., Madrid, Spain); morphine HCl and heroin HCl (Unión Químico-Farmacéutica S.A.E., Madrid, Spain); SNC-80 ((+)-4-[(α R)- α -(2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide), (-)-U-50488-HCl (1S-trans)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidiny)cyclohexyl]-benzeneacetamide), naloxone HCl, naltrindole HCl, nor-binaltorphimine HCl, and SL 327 (α -amino-(4-aminophenyl-thio)-methylene-2-(trifluoromethyl)-benzeneacetonitrile) (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK). Acrylamide (Protogel) was from Conda, S.A., Spain. Other materials such as the secondary antibodies, ECL reagents and autoradiography films were purchased from Amersham International (UK) or Santa Cruz Biotechnology (USA). All other chemicals were from Sigma Chemical.

RESULTS

Immunodetection and Subcellular Localization of FADD in Brain Tissue

In Western blot analyses, the antibody H-181 (mapping at the FADD C-terminal) recognized various closely migrating bands with sizes of about 51-75 kDa from rat, mouse and human brain (total homogenate), which represented specific FADD forms since they were not immunodetected with the preabsorbed antibody (Figure 1A). The

enzymatic dephosphorylation of FADD with alkaline phosphatase (total homogenate and cytosolic fraction) increased the reactivity of some bands and induced an apparent change in the protein Mr shifting its mobility (51- and 75-kDa forms), indicating that this antibody reacted with FADD independently of the state of protein phosphorylation (Figure 1B). Similar results were obtained with another antibody (N-18, mapping at the N-terminal), which also immunodetected a peptide of about 25-kDa (with a weak signal and difficult to quantitate) corresponding to FADD monomer (identified with a positive control) (data not shown). These results indicated that in brain tissue FADD also has the ability to aggregate (Siegel et al., 2000), being mainly expressed as a homodimer/trimer. In rat brain, FADD was localized in the plasma membrane as well as in the cytoplasmic and nuclear compartments (Figure 1C). From these preliminary experiments, the effects of opiate drugs on 51-kDa FADD (antibody H-181) were assessed in total homogenate of brain tissue.

Acute Effects of Opiate Drugs on FADD Immunoreactivity in Rat Brain

The acute treatment with sufentanil (a potent μ -opioid receptor agonist; 1-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., 30 min), compared with vehicle solution administration, induced modest increases (12-22%, $p > 0.05$, at low doses) or marked decreases (40-58%, $p < 0.01$, at high doses) in the immunodensity of FADD in the cerebral cortex (Figure 2A), with a rapid time-course which lasted for about 60 min (Figure 2B). Similarly, acute morphine (3-100 mg/kg, i.p., 2 h) also induced bell-shaped dose-effects with increases (20-42%, $p < 0.01$; 10-30 mg/kg) and decreases (29%, $p < 0.05$; 100 mg/kg) in FADD density in the cortex (Figure 3A). Acute heroin (10 mg/kg, i.p., 2 h) also augmented FADD content in the same brain region ($37 \pm 4\%$, $n = 5$, $p = 0.002$). Pretreatment of rats with naloxone (10

mg/kg) fully prevented the acute inhibition of FADD induced by 15 µg/kg sufentanil (Figure 2C).

The acute treatment with SNC-80 (a selective δ -gonist; 10 mg/kg, i.p., 30 min) decreased the immunodensity of FADD in the cortex (56%, $p < 0.001$) for more than 1 h (Figure 4A/B), and this effect was antagonized by the selective δ -antagonist naltrindole (5 mg/kg) (Figure 4C). Treatment with U50488H (a selective κ -agonist; 10 mg/kg, i.p., 1 h) also reduced FADD content in the cortex (36%, $p < 0.001$) and the effect lasted for more than 2 h (57%, $p < 0.0001$) (Figure 5A/B). This inhibitory effect of U50488H on FADD was blocked by the selective κ -antagonist nor-binaltorphimine (5 mg/kg) (Figure 5C). Lower doses of SNC-80 and U50488H (1 and 3 mg/kg) did not alter the content of FADD in the brain (Figures 4A and 5A).

Effects of Chronic Opiate Drugs, and of Antagonist-Precipitated or Natural Opiate Withdrawal on FADD Immunoreactivity in Rat Brain

Chronic (5 days) treatment with morphine (10-100 mg/kg), compared with saline solution administration, did not alter significantly the immunodensity of FADD in the cerebral cortex (2 h post-treatment) (Figure 3B), indicating the induction of tolerance to the acute effect of the opiate. In morphine-dependent rats, naloxone (2 mg/kg)-precipitated withdrawal (2 h) induced a modest decrease in the density of FADD (13%, $p > 0.05$), but the spontaneous opiate withdrawal (24 h and 48 h) was associated with a marked and time-dependent down-regulation of FADD content in the cortex (32% and 50%, respectively, $p < 0.05$) (Figure 3B).

The repeated treatment (5 days) with SNC-80 (10 mg/kg) or U50488H (10 mg/kg), compared with the corresponding vehicle, did not modify the density of FADD in the cortex (Figures 4D and 5D), which also suggests the induction of tolerance to the acute

effects of these opiates on this protein. In SNC-80-tolerant rats, naltrindole (2 mg/kg)-precipitated withdrawal (2 h) induced a significant reduction of FADD content in the cortex (35%, $p < 0.05$) (Figure 4D). In U50488H-tolerant rats, nor-binaltorphimine (2 mg/kg)-precipitated withdrawal (2 h) did not induce significant changes in the density of FADD in the cortex (Figure 5D).

The various opiate treatments (acute, chronic and withdrawal effects) did not alter significantly the immunodensity of β -actin, which was used as a negative control (data not shown).

Effect of MEK Inhibition on δ -Agonist-Induced Down-Regulation of FADD in Rat Brain

The highly selective MEK1/2 inhibitor, SL 327, was used as a tool to assess the possible involvement of ERK1/2 activation in the in vivo regulation of FADD by the selective δ -agonist SNC-80 (Figure 6). The δ -opioid receptor was chosen as a target because it appears to regulate the expression of FADD (tonic inhibition) in the brain (see Discussion).

Pretreatment of rats with SL 327 (20 mg/kg, i.p.) fully prevented the down-regulation of FADD content induced by SNC-80 (10 mg/kg, 30 min) both in the cerebral cortex (decrease: 43%, $p < 0.05$) and corpus striatum (decrease: 29%, $p < 0.05$) (Figure 6A/B). SL 327 (90 min) alone did not alter the density of FADD (Figure 6A/B). In both brain regions, SL 327 by itself reduced, as expected, the basal activity of phosphorylated ERK1/2 (p44/42 MAP kinases, 15-46%, $p < 0.05$) and augmented that of phosphorylated MEK1/2 (70-109%, $p < 0.01$) (this latter effect probably mediated by an intra-cascade feedback regulation; see Kolch et al., 2005), without altering the total content of MEK/ERK proteins (Figure 6C/D). Moreover, SNC-80 increased the phosphorylation of

MEK1/2 (150-160%, $p < 0.01$) and ERK1/2 (31-51%, $p < 0.05$), and pretreatment with SL 327, consequently, blocked the activation of ERK1/2 but not that of MEK1/2 induced by the δ -agonist (Figure 6C/D). In these series of experiments, the content of β -actin remained unchanged after the various treatments (Figure 6A/B).

The inhibition of MAP kinase cascade with SL 327 did not alter significantly the abundance of Fas proteins (receptor glycosylated forms and complexes of Fas monomers) (data not shown), excluding alterations in Fas receptor expression as a mechanism behind the reported regulation of FADD in the brain.

Acute, chronic and withdrawal effects of opiate drugs on caspase-8 and caspase-3 immunoreactivities in rat brain

The various acute and chronic treatments with opiate drugs (μ - δ - and κ -agonists) and the induced opiate withdrawals did not modify significantly the immunodensities of the proforms of caspase-8 (55 kDa) and caspase-3 (32 kDa) in the cerebral cortex (Table 1 and Figure 7). Moreover, the basal activation and cleavage of caspase-8 (about p20 kDa cleavage form) were not altered by any opiate treatment or withdrawal state in the cortex (see Figure 7 for chronic morphine). The antibody used for the detection of caspase-3 only recognized the 32 kDa proform in brain tissue (see Figure 7).

DISCUSSION

FADD protein in rat, mouse and human brains was recognized as non-phosphorylated (faster-migrating) and phosphorylated (slower-migrating) species (see Zhang and Winoto, 1996; Scaffidi et al., 2000), indicating that the antibody used (H-181) reacted with FADD independently of the state of protein phosphorylation. Previous results (García-Fuster et al., 2003a) and the current data demonstrated that the proteins that

constitute the DISC (Fas, FADD, and caspase-8) are constitutively present in brain membranes. The DISC appears to contain a 3:3:3 stoichiometric ratio of proteins, which are organized by the trimeric structure of the preassembled Fas receptor (Siegel et al., 2000). In fact, mutant (defective) Fas cannot recruit three FADD molecules and consequently do not form a DISC (review in Tibbetts et al., 2003). In brain tissue, only the monomeric form of procaspase-8 was immunodetected as described in other cell systems (see Donepudi et al., 2003). In contrast, the monomeric form of FADD (about 25 kDa) was not detected in the postnatal (P1-P22) rat cerebral cortex (Cheema et al., 1999) or it showed a weak signal in the adult rat cortex (current results). Therefore, FADD protein (antibody H-181) in brain is mainly expressed as a homo-dimer/trimer forms as reported in this study. In line with this, Fas receptor (35 kDa) aggregates of about 110/120 kDa (trimers) have been also identified in the rat brain (García-Fuster et al., 2004a).

The main results indicate that (1) the acute treatments with μ - (sufentanil, morphine), δ - (SNC-80) and κ - (U50488H) opiate agonists induced down-regulations of FADD content in the brain through the activation of the corresponding opioid receptor; (2) the repeated administration of opiate drugs resulted in the induction of tolerance to their acute inhibitory effects on FADD; (3) opiate withdrawal in μ - and δ -opiate tolerant rats was also associated with FADD down-regulation; and (4) a selective MEK1/2 inhibitor (SL 327) prevented the down-regulation of FADD induced by SNC-80, demonstrating the involvement of ERK1/2 activation in the *in vivo* regulation of FADD by opiate drugs.

Concerning the acute effects of opiate drugs, sufentanil and morphine induced bell-shaped dose-effects on the immunodensity of FADD (increases and decreases), although the inhibitory effects were more remarkable, as it was the case for SNC-80 and

U50488H. In this context, opiate drugs and various apoptotic agents have been shown to induce biphasic effects in multiple biological systems, with moderate stimulatory responses and marked inhibitory effects (Calabrese, 2001a,b). The present data demonstrate that μ - δ - and κ -opioid receptors may all have a role in the acute pharmacologic regulation of FADD, although recent findings indicate a preponderant input of the δ -receptor in the functional regulation of this key apoptotic protein in the brain. Thus, it has been observed that in δ -opioid receptor deficient mice, but not in μ - and κ -receptor knockout mice, the basal immunodensity of FADD is increased in the cerebral cortex ($48 \pm 12\%$, $n = 5$, $p < 0.01$), suggesting the existence of an endogenous opioid tone that acting on δ -receptors tonically inhibits FADD expression in the brain (García-Fuster et al., 2004b; Ms. in preparation).

In contrast to the acute treatments with μ -, δ - and κ -agonists on FADD content (down-regulation), the chronic administration (5 days) of morphine, SNC-80 and U50488H resulted in the induction of tolerance to the initial inhibitory effects of the opiates, which most probably reflected the corresponding process of receptor desensitization reported after repeated agonist exposure (Okura et al., 2003; Liu-Chen, 2004; Dang and Williams, 2004). Notably, in μ - and δ -, but not in κ -, opiate tolerant rats, antagonist-precipitated or spontaneous opiate withdrawal induced a new and sustained inhibitory stimulus on FADD (lasting more than 2 days in the case of morphine withdrawal), which could be related to the large increase in the release of enkephalins (endogenous ligands for μ - and δ -opioid receptors) observed in the brains of chronic morphine-withdrawn rats (Mas-Nieto et al., 2002), which also displayed higher numbers of c-Fos-positive neurons identified as enkephalinergic neurons (Veinante et al., 2003).

A relevant finding of this investigation was the identification of a molecular mechanism (activation of ERK1/2 MAP kinase signaling) responsible for the ability of the δ -agonist SNC-80 to decrease FADD content in the brain. Thus, treatment of rats with 20 mg/kg of SL 327 (a dose that selectively blocks MEK1/2 activity and induces significant neurochemical effects in the CNS; see Ferguson and Robinson, 2004), abolished the decrease in FADD produced by SNC-80 in the cerebral cortex and corpus striatum. Moreover and as expected, SL 327 was also able to blocked the activation of ERK1/2, but not that of MEK1/2, induced by SNC-80. These results clearly demonstrated the direct involvement of the two MAP kinases (sequential activation of MEK and ERK) in the in vivo regulation of FADD by the opiate. The same molecular mechanism can be postulated for the inhibitory effect of morphine on FADD, since this opiate also activated ERK1/2 in rat brain and failed to do so in SH-SY5Y cells after inhibition (PD98059) of MEK1/2 (Ferrer-Alcón et al., 2004). It should be mentioned that inhibition of MAP kinase signaling (SL 327) did not modify the various forms of Fas in the same brains, excluding alterations in the density of this receptor in the regulation of FADD.

The down-regulation of FADD induced by opiate drugs may be related to the recently uncovered neuroprotective or survival-promoting effects associated with extra-analgesic doses of opiates (acute effects) in various systems (Tegeder and Geisslinger, 2004). In the CNS, Fas was shown to induce apoptosis (Felderhoff-Mueser et al., 2000; Sastry and Rao, 2000) or, conversely, to deliver survival signals (e.g. neurite growth, Desbarats et al., 2003). In previous studies in rats (Boronat et al., 2001; García-Fuster et al., 2003a, 2004a), heroin/morphine addiction and opiate withdrawal were associated with up-regulation of Fas (native receptor and complexes of monomers relevant in Fas signaling) in the brain. In the current study, FADD, the adaptor protein that couples Fas to caspase-

8 and transmits the death signal, followed an opposite modulation. Together, the results suggest that possible apoptotic signals engaged by Fas activation (see Tegeder and Geisslinger, 2004) would be offset by decreased signal transduction through FADD and effector caspases-8/3 (not altered by any opiate treatment). Since the activation of ERK1/2 is crucial for various anti-apoptotic mechanisms (Wada and Penninger, 2004), including protection against Fas-mediated apoptosis (Holmström et al., 1999, 2000), it is tempting to conclude that opiate drugs (and specifically the δ -agonists) could promote survival signals in the brain through inhibition of FADD, which in turn is dependent on the activation of ERK1/2 signaling. In this context, recent studies have shown that activation of δ -opioid receptors can protect neocortical neurons from glutamate excitotoxicity (Zhang et al., 2000) and to induce other cytoprotective effects (Barry and Zuo, 2005).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants SAF2004-03685 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Programa Nacional de Biomedicina, MEC and FEDER, Madrid, Spain) and PRIB-2004-10147 (Conselleria d'Economia, Hisenda i Innovació, Govern Balear, Palma de Mallorca, Spain). MJG-F was supported by a predoctoral fellowship from CSIC/MEC-Associated Units (Madrid, Spain). JAG-S is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Spain).

REFERENCES

- Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* **22**: 207-220.
- Ammon S, Mayer P, Riechert U, Tischmeyer H, Höllt V (2003). Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal. *Mol Brain Res* **112**: 113-125.
- Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME (2003). The CD95 type I/type II model. *Sem Immunol* **15**: 185-193.
- Barry U, Zuo Z (2005). Opioids: Old drugs for potential new applications. *Curr Pharm Des* **11**: 1343-1350.
- Boronat MA, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2001). Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *Br J Pharmacol* **134**: 1263-1270.
- Brandt MR, Furness MS, Rice KC, Fischer BD, Negus S (2001). Studies of tolerance and dependence with the δ -opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys responding under a schedule of food presentation. *J Pharmacol Exp Ther* **299**: 629-637.
- Budd RC (2002). Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* **109**: 437-442.
- Büttner A, Mall G, Penning R, Weis S (2000). The neuropathology of heroin abuse. *Foren Sci Intern* **113**: 435-442.
- Calabrese EJ (2001a). Opiates: Biphasic dose responses. *Crit Rev Toxicol* **31**: 585-604.
- Calabrese EJ (2001b). Apoptosis: Biphasic dose responses. *Crit Rev Toxicol* **31**: 607-613.

- Cheema ZF, Wade SB, Sata M, Walsh K, Sohrabji F, Miranda RC (1999). Fas/Apo [apoptois]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: Induction of caspase-dependent cell death and activation of NF- κ B. *J Neurosci* **19**: 1754-1770.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505-512.
- Cohen GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326**: 1-16.
- Dang VC, Williams JT (2004). Chronic morphine treatment reduces recovery from opioid desensitization. *J Neurosci* **24**: 7699-7706.
- Desbarats J, Birge RB, Minouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK (2003). Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nature Cell Biol* **5**: 118-125.
- Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, Grütter MG (2003). Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* **11**: 543-549.
- Felderhoff-Mueser U, Taylor DL, Greenwood K, Kozma M, Stibenz D, Joashi UC, Edwards AD, Mehmet H (2000). Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol* **10**: 17-29.
- Ferguson SM, Robinson TE (2004). Amphetamine-evoked gene expression in striatopallidal neurons: regulation by corticostriatal afferents and the ERK/MAPK signaling cascade. *J Neurochem* **91**: 337-348.
- Ferrer-Alcón M, García-Sevilla JA, Jaquet PE, La Harpe R, Riederer BM, Walzer C, Guimón J (2000). Regulation of nonphosphorylated and phosphorylated forms of neurofilament proteins in the prefrontal cortex of human opioid addicts. *J Neurosci Res* **61**: 338-349.

- Ferrer-Alcón M, García-Fuster MJ, La Harpe R, García-Sevilla JA (2004). Long-term regulation of signalling components of adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase in the pre-frontal cortex of human opiate addicts. *J Neurochem* **90**: 220-230.
- Gabilondo AM, García-Sevilla JA (1995). Spontaneous withdrawal from long-term treatment with morphine accelerates the turnover of α_2 -adrenoceptors in rat brain: Up-regulation of receptors associated with increased receptor appearance. *J Neurochem* **64**: 2590-2597.
- García-Fuster MJ, Ferrer-Alcón M, Miralles A, García-Sevilla JA (2003a). Modulation of Fas receptor proteins and dynamin during opiate addiction and induction of opiate withdrawal in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **368**: 421-431.
- García-Fuster MJ, Miralles A, García-Sevilla JA (2003b). Regulation of Fas-associated death domain (FADD) protein during opiate addiction in the rat brain. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* **25 (Suppl. A)**: 125.
- García-Fuster MJ, Ferrer-Alcón M, Miralles A, García-Sevilla JA (2004a). Deglycosylation of Fas receptor and chronic morphine treatment up-regulate high molecular mass Fas aggregates in the rat brain. *Eur J Pharmacol* **496**: 63-69.
- García-Fuster MJ, Miralles A, Martín M, Maldonado R, García-Sevilla JA (2004b). Fas receptor and Fas-associated death domain (FADD) in the cerebral cortex of μ -, δ -, or κ -opioid receptor knock-out mice. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* **26 (Suppl. A)**: 78.
- Gómez-Angelats M, Cidlowski JA (2003). Molecular evidence for the nuclear localization of FADD. *Cell Death Differ* **10**: 791-797.
- Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, Wicovsky A, Peters N, Warnke C, Pfizenmaier K, Wajant H (2005). The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the

- formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol* **168**: 1087-1098.
- Holmström TH, Tran SEF, Johnson VL, Ahn NG, Chow SC, Eriksson JE (1999). Inhibition of mitogen-activated kinase signaling sensitizes HeLa cells to Fas receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **19**: 5991-6002.
- Holmström TH, Schmitz I, Söderström TS, Poukkula M, Johnson VL, Chow SC, Krammer PH, Eriksson JE (2000). MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J* **19**: 5418-5428.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**: 5579-5588.
- Kolch W, Calder M, Gilbert D (2005). When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Lett* **579**: 1891-1895.
- Kyosseva SV (2004). Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int Rev Neurobiol* **59**: 201-220.
- MacEwan DJ (2002). TNF ligands and receptors – a matter of life and death. *Br J Pharmacol* **135**: 855-875.
- Lambert C, Landau AM, Desbarats J (2003). Fas-beyond death: A regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* **8**: 551-562.
- Liu-Chen L-Y (2004). Agonist-induced regulation and trafficking of κ opioid receptors. *Life Sci*. **75**: 511-536.
- Marie-Claire C, Courtin C, Roques BP, Noble F (2004). Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. *Neuropsychopharmacology* **29**: 2208-2215.

- Mas Nieto M, Wilson J, Cupo A, Roques BP, Noble F (2002). Chronic morphine treatment modulates the extracellular levels of endogenous enkephalins in rat brain structures involved in opiate dependence: A microdialysis study. *J Neurosci* **22**: 1034-1041.
- Milanés MV, Laorden ML (1998). Effects of U-50,488H withdrawal on catecholaminergic neurones of the rat ventricle. *Br J Pharmacol* **124**: 1060-1064.
- Miralles A, Esteban S, Sastre-Coll A, Moranta D, Asensio VJ, García-Sevilla JA (2005). High-affinity binding of β -carbolines to imidazoline I_{2B} receptors and MAO-A in rat tissues: Norharman blocks the effect of morphine withdrawal on DOPA/noradrenaline synthesis in the brain. *Eur J Pharmacol*. In press.
- Nagata S, Golstein P (1995). The Fas death receptor. *Science* **267**: 1449-1456.
- Nestler EJ (1996). Under siege: the brain on opiates. *Neuron* **16**: 897-900.
- Okura T, Varga EV, Hosohata Y, Navratilova E, Cowell SM, Rice K, Nagase H, Hruby VJ, Roeske WR, Yamamura HI (2003). Agonist-specific down-regulation of the human δ -opioid receptor. *Eur J Pharmacol* **459**: 9-16.
- Sastry PS, Rao KS (2000). Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* **74**:1-20.
- Scaffidi C, Volkland J, Blomberg I, Hoffmann I, Krammer PH, Peter ME (2000). Phosphorylation of FADD/MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J Immunol* **164**:1236-1242.
- Scherle PA, Ma W, Lim H, Dey S, Traskos JM (2000). Regulation of cyclooxygenase-2 induction in the mouse uterus during decidualization. *J Biol Chem* **275**: 37086-37092.
- Siegel RM, Ka-Ming Chang F, Chun HJ, Lenardo MJ (2000). The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature Immunol* **1**: 469-474.

- Tegeder I, Geisslinger G (2004). Opioids as modulators of cell death and survival - Unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev* **56**: 351-369.
- Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ (2003). The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nature Immunol* **4**: 404-409.
- Tourneur L, Buzyn A, Chiocchia G (2005). FADD adaptor in cancer. *Med Immunol* **4**: 1-9.
- Veinante P, Stoeckel M-E, Lasbennes F, Freund-Mercier M-J (2003). c-Fos and peptide immunoreactivities in the central extended amygdala of morphine-dependent rats after naloxone-precipitated withdrawal. *Eur J Neurosci* **18**: 1295-1305.
- Wada T, Penninger JM (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**: 2838-2849.
- Wang J, Charboneau R, Barke RA, Loh HH, Roy S (2002). μ -Opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J Immunol* **169**: 3630-3636.
- Yin D, Mufson RA, Wang R, Shi Y (1999). Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature* **397**: 218.
- Zhang J, Winoto A (1996). A mouse Fas-associated protein with homology to the human Mort1/FADD protein is essential for Fas-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **16**: 2756-2763.
- Zhang J, Haddad GG, Xia Y (2000). Delta-, but not mu- and kappa-, opioid receptor activation protects neocortical neurons from glutamate-induced excitotoxic injury. *Brain Res* **885**: 143-153.
- Zhang J, Zhang D, Hua Z (2004). FADD and its phosphorylation. *IUBMB Life* **56**: 395-401.

Table 1 Effects of various opiate drug treatments on caspase-8 and caspase-3 protein immunoreactivities in the rat cerebral cortex

Treatment (time)	Dose (mg/kg)	Caspase-8 (55 kDa)		Caspase-3 (32 kDa)	
		(% value)	n	(% value)	n
Saline	-	93±12	4	100±5	5
Sufentanil (60 min)	0.015	72±9	4	95±6	4
Saline	-	101±3	4	101±2	6
Morphine (2 h)	100	103±11	4	99±2	4
Chronic saline (5 days)	-	100±2	8	100±2	5
Chronic morphine (5 days)	10-100	106±8	6	96±3	5
+ Naloxone	2	111±9	7	88±4	5
+ SW 48 h	-	97±3	4	93±11	5
DMSO	-	100±5	11	101±3	11
SNC-80 (30 min)	10	93±7	9	106±8	9
Chronic DMSO (5 days)	-	99±10	6	100±3	8
Chronic SNC-80 (5 days)	10	114±8	4	95±2	5
+ Naltrindol	5	117±7	5	103±5	5
Saline	-	102±7	6	100±4	10
U 50488-H (1 h)	10	94±7	4	99±7	8
Chronic saline (5 days)	-	100±9	5	100±6	5
Chronic U 50488-H (5 days)	10	100±12	5	109±9	5
+ Nor-binaltorphimine	5	98±14	5	107±12	5

Data represent mean ± SEM, and are expressed as percentage of the corresponding saline group (100%). SW: spontaneous withdrawal. Student's t-test or ANOVA followed by Bonferroni's test did not detect significant changes after the various treatments.

Legends to figures

Figure 1. (A) Representative autoradiograms of Western blots depicting labelling of immunodetectable FADD (\approx 51-75 kDa forms) with antibody H-181 in rat brain (RB, cerebral cortex), mouse brain (MB, cerebral cortex) and human brain (HB, prefrontal cortex). The samples (40 μ g protein of total homogenate) were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (immunoblotting), incubated with the primary and secondary antibodies, and visualized by the Enhanced Chemiluminescence method. The specificity of the antibody was assessed by preincubation with its antigenic peptide (preabsorbed antibody), which resulted in the blockade of protein immunoreaction. **(B)** Representative immunoblot for the effect of dephosphorylation with alkaline phosphatase on FADD immunoreactivity in rat brain. Brain tissue (H: total homogenate; S2: cytosolic fraction) was incubated at 30°C for 15 min in the absence (C, control samples) or presence (AP) of alkaline phosphatase (95 units). Samples containing the enzyme were also incubated with 100 mM sodium pirophosphate (IC, inhibited controls). The amount of protein loaded on the gel was 40 μ g for all samples. Note that FADD dephosphorylation did not block the immunoreactivity of the antibody H-181 (i.e., the antibody reacted with FADD independently of the state of protein phosphorylation). **(C)** Representative immunoblot depicting the subcellular localization of FADD in rat brain (H: total homogenate, 57 μ g protein; S2: cytosolic fraction, 30 μ g protein; P2: crude membrane fraction, 72 μ g protein; N: nuclear fraction, 27 μ g protein). The apparent molecular mass of FADD forms were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left hand side. In each experiment all samples were run in the same gel.

Figure 2. Acute effects of sufentanil on FADD immunodensity in rat brain (cerebral cortex). **(A)** Dose-response effects. Groups of treatments: saline (C, $n = 6$), sufentanil (1-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., 30 min; $n = 3-4$). Columns are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected a significant difference between the groups of treatments [$F(5,18) = 23.8$, $p < 0.0001$]. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ when compared with the saline group (ANOVA followed by Bonferroni's test). **(B)** Time-course (0-120 min) effects (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$; $n = 4-8$). Other details as above. ANOVA [$F(3,16) = 14.3$, $p < 0.0001$]: $***p < 0.0001$ vs control. **(C)** Antagonism by naloxone. Groups of treatments: saline (C, $n = 6$), sufentanil (Suf, 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 30 min; $n = 5$), naloxone (Nlx, 10 mg/kg, i.p., 90 min; $n = 4$) and Nlx + Suf ($n = 5$). Other details as above. ANOVA [$F(3,16) = 11.5$, $p < 0.005$]: $***p < 0.0001$ vs control; $\dagger p < 0.01$ vs sufentanil. Bottom **(A/B/C)**: representative immunoblot for each set of experiments (sample: 40 μg protein).

Figure 3. Acute, chronic and withdrawal effects of morphine on FADD immunodensity in rat brain (cerebral cortex). **(A)** Acute dose-response effects. Groups of treatments: saline (C, $n = 6$), morphine (3-100 mg/kg, i.p., 2 h; $n = 4-5$). Columns are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected a significant difference between the groups of treatments [$F(4,19) = 12.2$, $p < 0.0001$]. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ when compared with the saline group (ANOVA followed by Bonferroni's test). **(B)** Chronic effects of saline (C, $n = 9$) and morphine (M, 10-100 mg/kg for 5 days; $n = 9$) followed by naloxone (Nlx, 2 mg/kg, i.p.; $n = 9$)-precipitated (2 h) or spontaneous (SW, 24 and 48 h; $n = 4-5$) opiate withdrawal. Other details as above. ANOVA [$F(4,31) = 7.3$, $p < 0.005$]: $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ vs chronic saline; $\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.001$ vs chronic morphine.

Bottom (A/B): representative immunoblot for each set of experiments (sample: 40 μ g protein).

Figure 4. Acute, chronic and withdrawal effects of SNC-80 (a selective δ -opioid receptor agonist) on FADD immunodensity in rat brain (cerebral cortex). **(A)** Acute dose-response effects. Groups of treatments: saline (C, n = 10), SNC-80 (1-10 mg/kg, i.p., 30 min; n = 4-5). Columns are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected a significant difference between the groups of treatments [F(3,20)= 21.5, $p < 0.0001$]. $**p < 0.001$ when compared with the saline group (ANOVA followed by Bonferroni's test). **(B)** Time-course (0-120 min) effects (10 mg/kg; n = 4-6). Other details as above. ANOVA [F(3,14)= 22.5, $p < 0.0001$]: $*p < 0.05$, $**p < 0.001$ vs control. **(C)** Antagonism by naltrindole (δ -selective). Groups of treatments: saline (C, n = 4), SNC-80 (SNC, 10 mg/kg, 30 min; n = 7), naltrindole (Nlt, 5 mg/kg i.p., 60 min; n = 3) and Nlt + SNC (n = 5). Other details as above. ANOVA [F(3,15)= 26.5, $p < 0.001$]: $**p < 0.001$ vs control; $\dagger p < 0.001$ vs SNC-80. **(D)** Chronic effects of saline (C, n = 8) and SNC-80 (SNC, 10 mg/kg for 5 days; n = 5) followed by naltrindole (Nlt, 5 mg/kg, i.p.)-precipitated (2 h) opiate withdrawal (n = 4). Other details as above. ANOVA [F(2,14)= 5.5, $p < 0.05$]: $*p < 0.05$ vs chronic SNC-80. Bottom (A/B/C/D): representative immunoblot for each set of experiments (sample: 40 μ g protein).

Figure 5. Acute, chronic and withdrawal effects of U50488H (a selective κ -opioid receptor agonist) on FADD immunodensity in rat brain (cerebral cortex). **(A)** Acute dose-response effects. Groups of treatments: saline (C, n = 7), U50488H (1-10 mg/kg, i.p., 1 h; n = 4). Columns are means \pm SEM of n experiments per group with an animal

per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected a significant difference between the groups of treatments [$F(3,15)= 11.2, p < 0.0005$]. $**p < 0.001$ when compared with the saline group (ANOVA followed by Bonferroni's test). **(B)** Time-course (0-120 min) effects (10 mg/kg; $n = 4-6$). Other details as above. ANOVA [$F(3,14)= 12.8, p < 0.0005$]: $*p < 0.05$, $***p < 0.0001$ vs control. **(C)** Antagonism by nor-binaltorphimine (κ -selective). Groups of treatments: saline (C, $n = 5$), U50488H (U, 10 mg/kg, 60 min; $n = 4$), nor-binaltorphimine (Nbt, 5 mg/kg i.p., 90 min; $n = 4$) and Nbt + U ($n = 5$). Other details as above. ANOVA [$F(3,14)= 7.1, p < 0.005$]: $**p < 0.001$ vs control; $\dagger p < 0.01$ vs U50488H. **(D)** Chronic effects of saline (C, $n = 5$) and U50488H (U, 10 mg/kg for 5 days, $n = 5$) followed by nor-binaltorphimine (Nbt, 5 mg/kg, i.p.)-precipitated (2 h) opiate withdrawal ($n = 5$). Other details as above. ANOVA did not detect a significant difference between the groups of treatments. Bottom **(A/B/C/D)**: representative immunoblot for each set of experiments (sample: 40 μg protein).

Figure 6. Effects of SL 327 (a selective MEK1/2 inhibitor) on the down-regulation of FADD immunodensity induced by the δ -agonist SNC-80 in rat brain (A, cerebral cortex and B, corpus striatum). **(A/B)** Groups of treatments: saline (C, $n = 5-6$), SNC-80 (SNC, 10 mg/kg, i.p., 30 min; $n = 4$), SL 327 (SL, 20 mg/kg, i.p., 90 min; $n = 3$) and SL + SNC ($n = 4$). Columns are means \pm SEM of n experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats. One-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments in the cortex [$F(3,12)= 5.67, p = 0.01$] and striatum [$F(3,12)= 4.87, p = 0.02$]. $*p < 0.05$ when compared with the corresponding saline group; $\dagger p < 0.05$ when compared with the corresponding SNC-80 group (ANOVA followed by Bonferroni's test). Bottom **(A/B)**: representative

immunoblots of FADD and β -actin (negative control) for each set of experiments (sample: 40 μ g protein). **(C/D)** Representative immunoblots of phosphorylated MEK1/2 (pMEK) and ERK1/2 (pERK or p44/42 MAP kinases) and total MEK and ERK proteins in the cortex and striatum after treatments of rats with saline (C), SNC-80 (SNC), SL 327 (SL), and SL 327 + SNC-80 as above. See text for mean results.

Figure 7. Representative immunoblots of pro-caspase-8 (and \approx p20 kDa cleavage form) and caspase-3 protein immunoreactivities in the rat cerebral cortex. Effects of chronic saline (C) and chronic morphine (M, 10-100 mg/kg for 5 days) followed by naloxone (Nlx, 2 mg/kg, i.p.)-precipitated (2 h) or spontaneous (SW, 48 h) opiate withdrawal (see also Table 1).

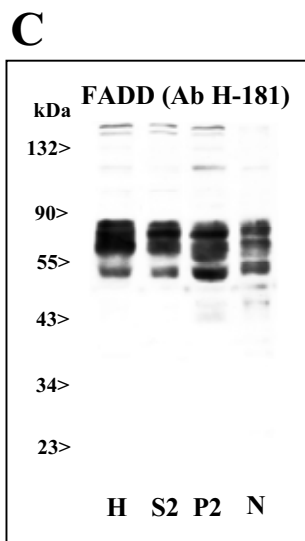
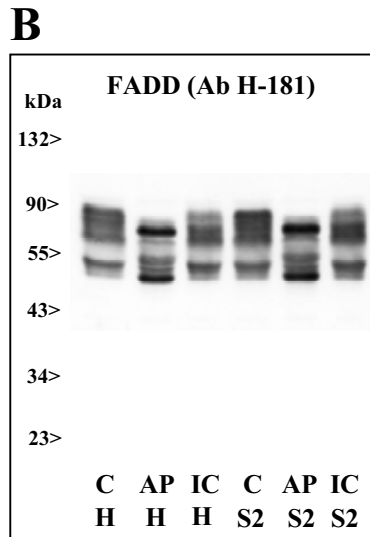
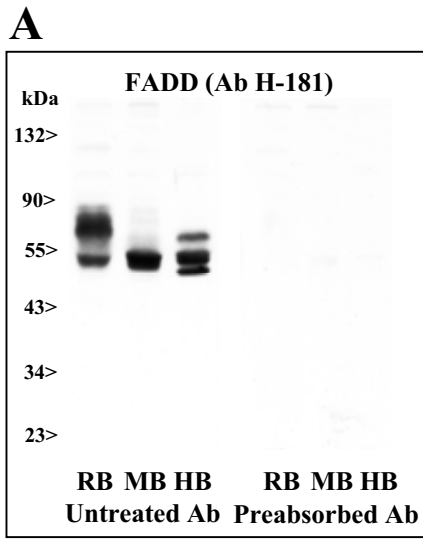


Fig. 1
García-Fuster et al.

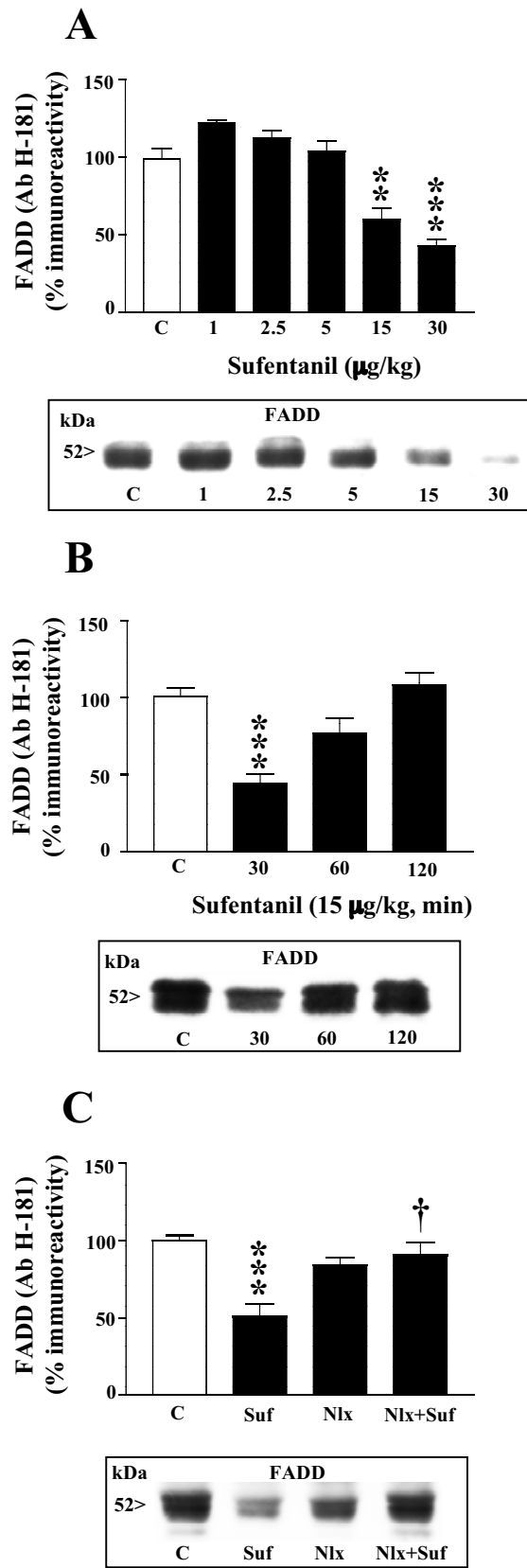


Fig. 2
García-Fuster et al., 2005

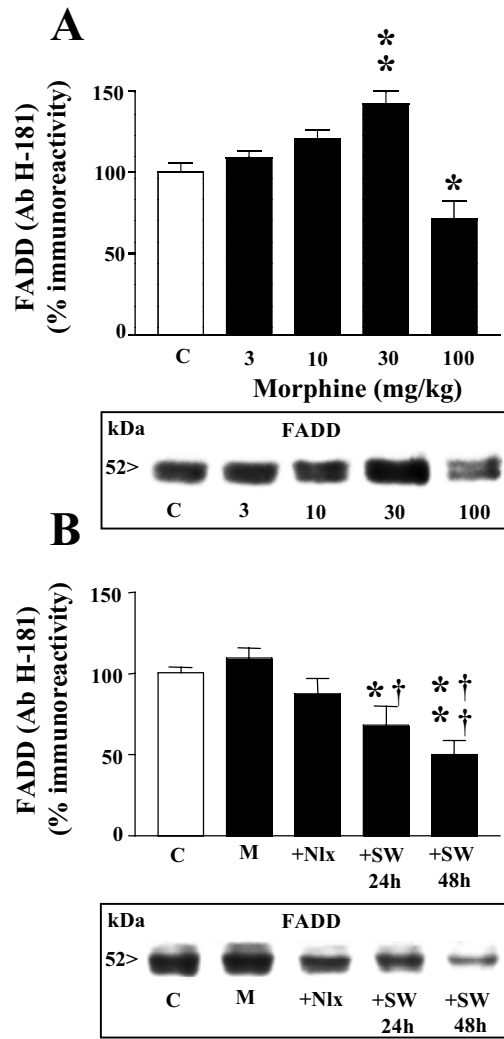


Fig. 3
García-Fuster et al.

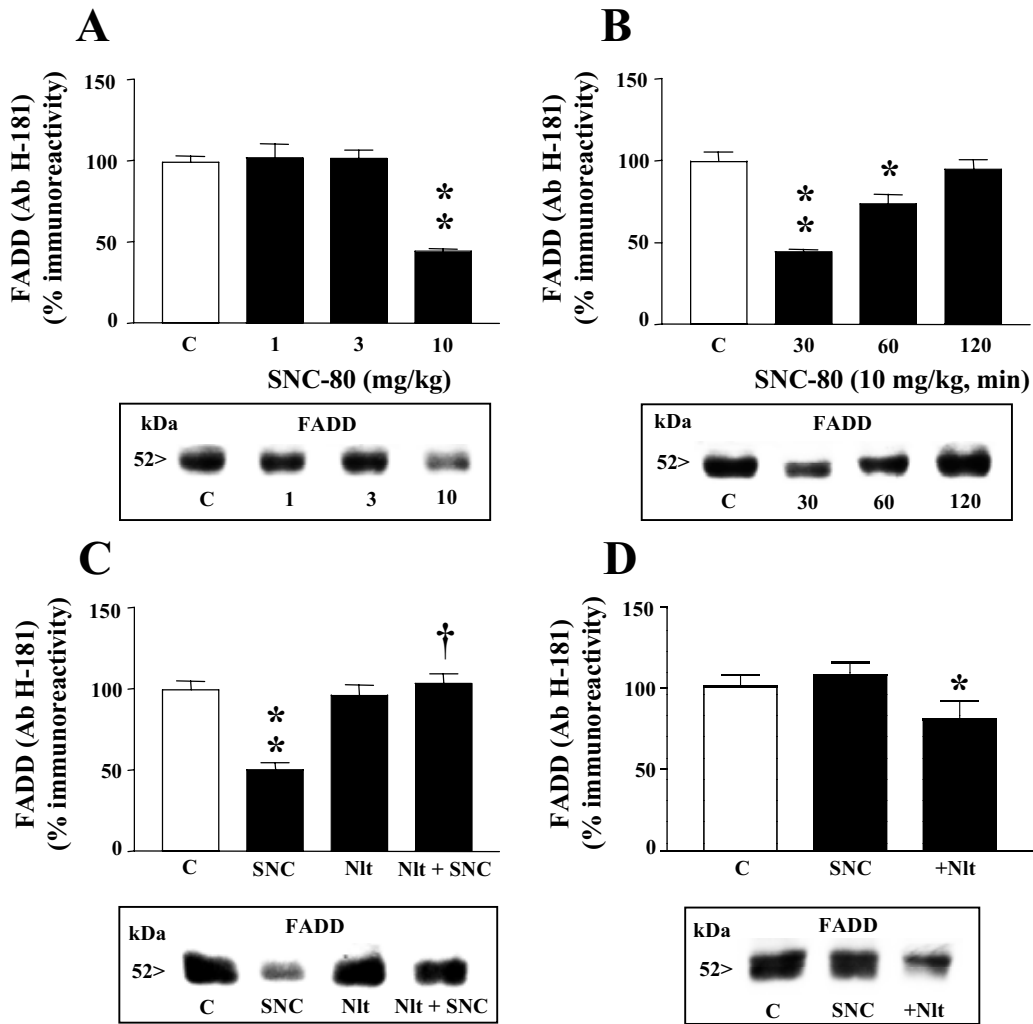


Fig. 4
García-Fuster et al.

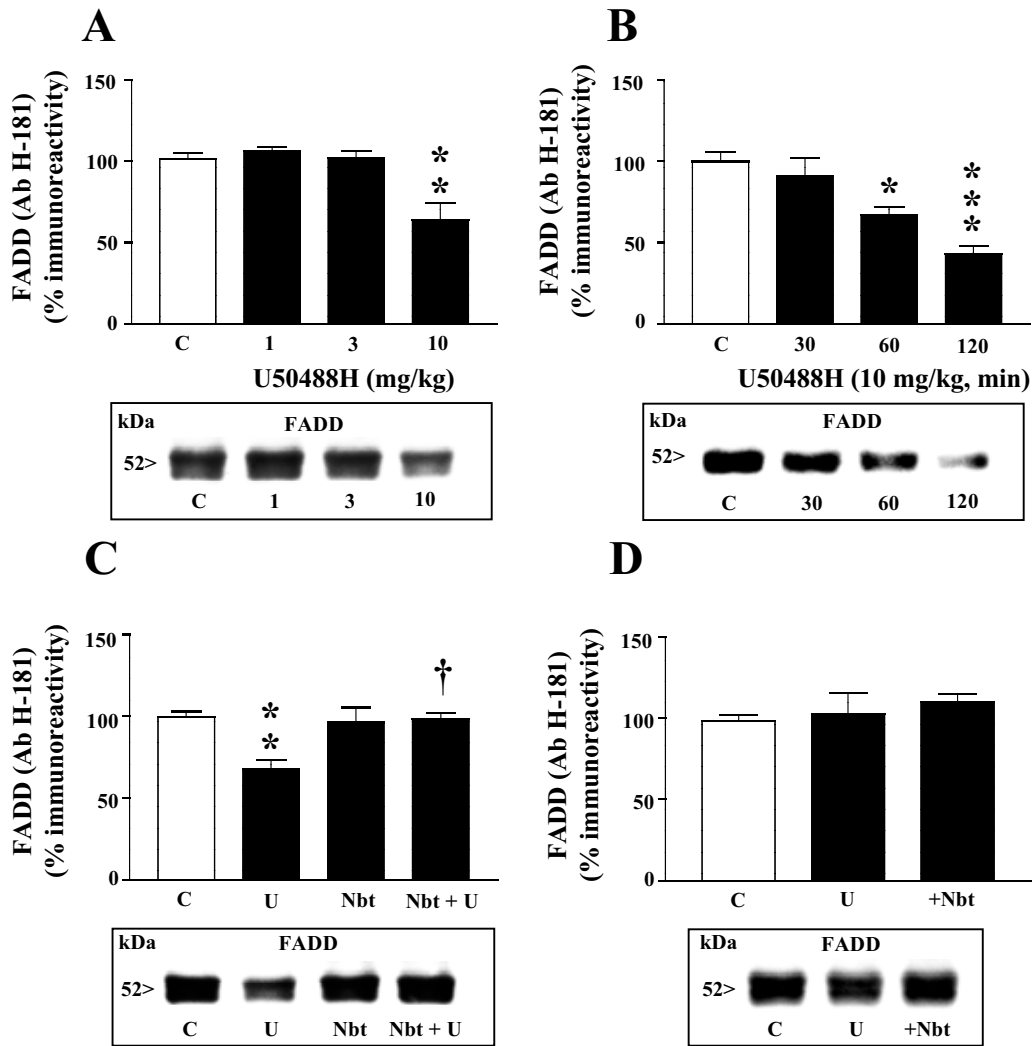


Fig. 5
García-Fuster et al.

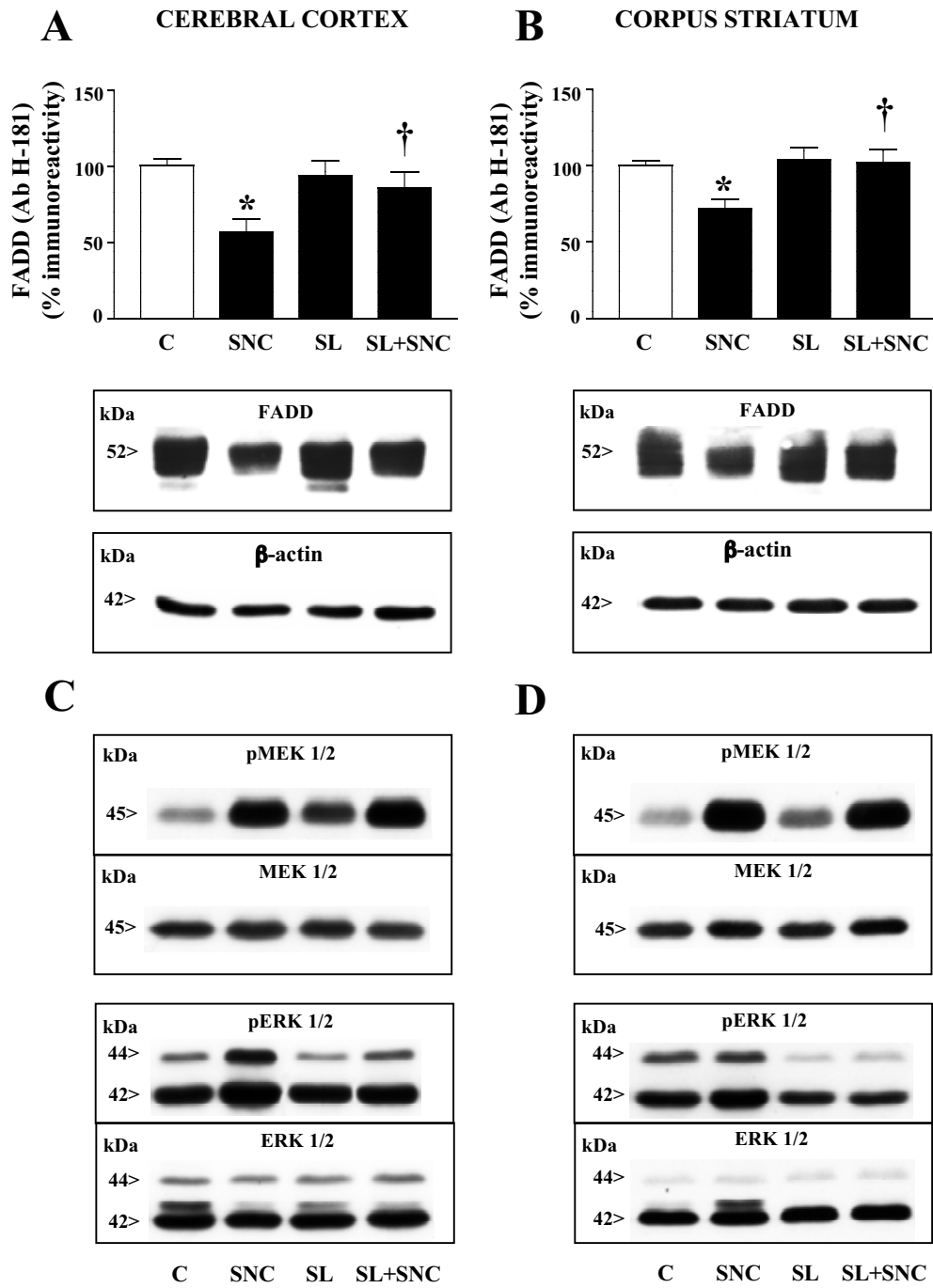


Fig. 6
García-Fuster et al.

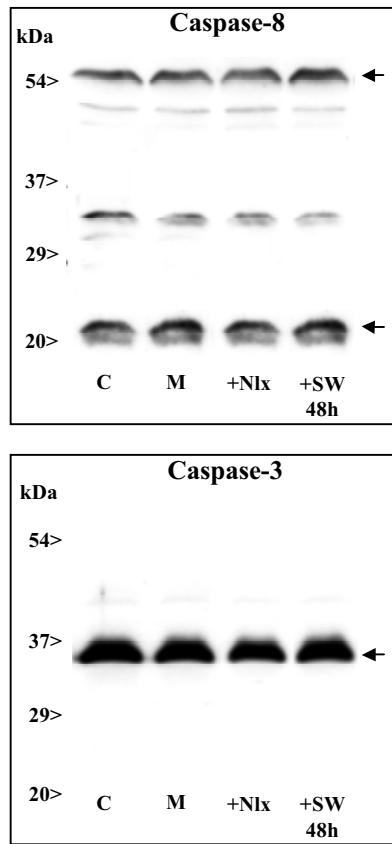


Fig. 7
García-Fuster et al., 2005

ANEXO EXPERIMENTAL I

**Regulación del complejo Fas/FADD en ratones
deficientes en receptores opioides
(Complemento de los Artículos II, III y IV)**

ANEXO EXPERIMENTAL I

Regulación del complejo Fas/FADD en ratones deficientes en receptores opioides. (Complemento de los artículos II, III y IV).

Recientemente se han utilizado ratones deficientes en receptores opioides para estudiar la posible existencia de un tono opioide endógeno regulador del complejo Fas/FADD, lo que tendría relevancia fisiológica. En ratones deficientes en el receptor μ -opioide se encontró disminuida (33%, véase figura 1) la inmunodensidad de la forma nativa de Fas (35 kDa) en cerebro, lo que sugiere que los receptores μ -opioides, a través de péptidos opioides endógenos (e.g., endomorfinas 1 y 2), estimulan la expresión de esta forma de Fas en cerebro. Sin embargo, el contenido de otras formas de Fas (formas glicosiladas de 48 y 51 kDa, y agregados de 120 y 203 kDa) no se alteró en el cerebro de estos ratones μ -KO (véase figura 1). En cerebro de ratones deficientes en el receptor δ -opioide las inmunodensidades de las formas agregadas de Fas (120 kDa) y de FADD se encontraron incrementadas (93% y 48%, respectivamente, véanse figuras 2 y 4), lo que sugiere que los receptores δ -opioides, a través de péptidos opioides endógenos (e.g., encefalinas, β -endorfinas), podrían inhibir la expresión de estas proteínas en cerebro. El receptor κ -opioide no parece estar involucrado en estas modulaciones de Fas/FADD (véanse figuras 3 y 4). Estos resultados sugieren que el sistema opioide modula diferencialmente las proteínas de la cascada apoptótica, involucrando al receptor μ -opioide en la regulación (activadora) de la forma nativa de Fas y al receptor δ -opioide en la regulación (inhibitoria) de la forma inicial de señalización del receptor Fas (agregados de 120 kDa) y de su proteína de acople, FADD.

Estudio en colaboración con el Dr. Rafael Maldonado (Universitat Pompeu Fabra, Barcelona).

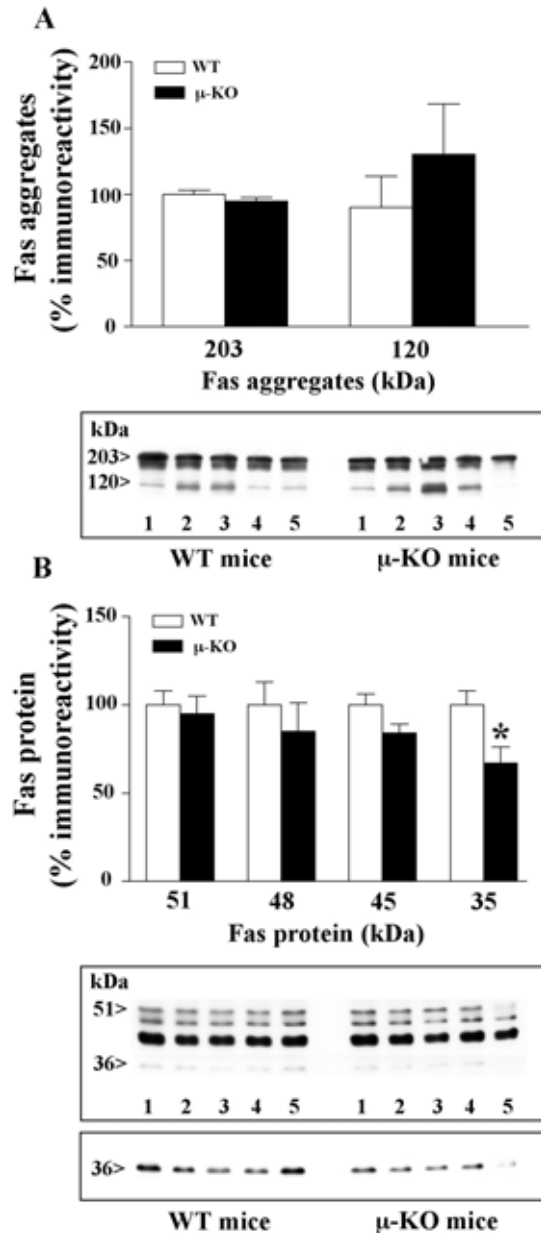


Figura 1. Efectos del genotipo receptor μ -opioide (WT versus μ -KO) sobre la inmunodensidad del receptor Fas (A: agregados de 203- y 120-kDa; B: formas glicosiladas de 51-, 48- y 45-kDa, y forma nativa de 35 kDa) en la corteza cerebral de ratón. Las columnas son los valores de la media \pm ESM (% de inmunoreactividad) de 2-3 experimentos por grupo, expresadas como porcentaje de cambio de los ratones μ -KO frente a su correspondiente grupo salino (WT). * $P < 0.05$ (test-t de Student). En los recuadros se muestran los “inmunoblots” representativos (40 μ g proteína) de las proteínas Fas en ratones WT y μ -KO tratados con solución salina (n=5 para cada grupo). Los distintos recuadros corresponden al mismo “inmunoblot” a diferentes tiempos de exposición para obtener la señal apropiada en la forma de Fas a cuantificar (agregados 1 minutos, formas glicosiladas 2 minutos y forma nativa 12 minutos).

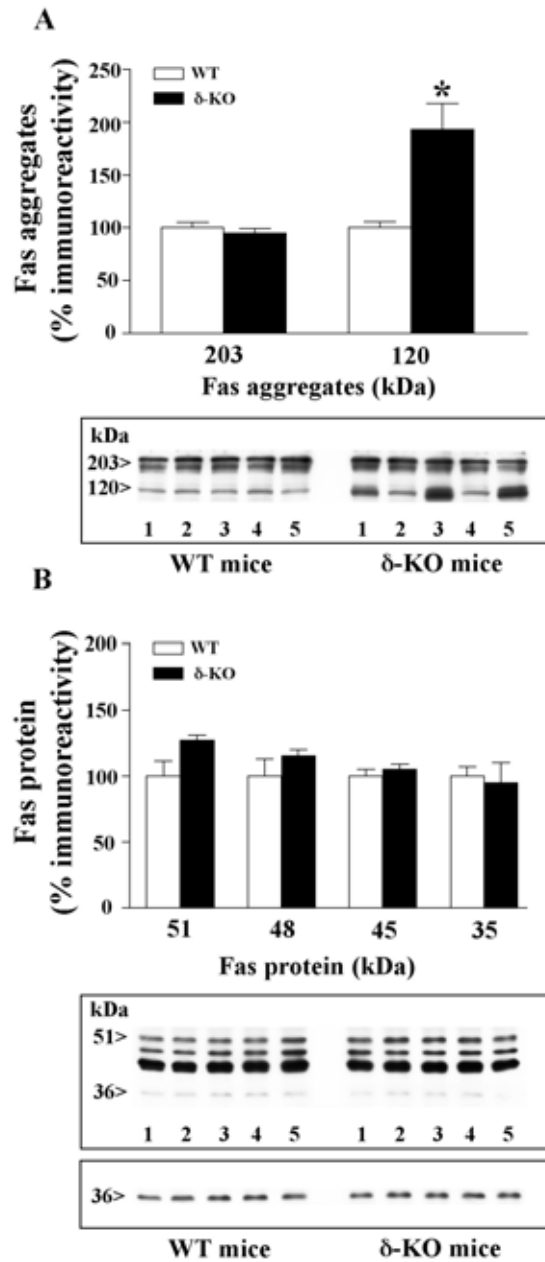


Figura 2. Efectos del genotipo receptor δ -opioides (WT versus δ -KO) sobre la inmunodensidad del receptor Fas (A: agregados de 203- y 120-kDa; B: formas glicosiladas de 51-, 48- y 45-kDa, y forma nativa de 35 kDa) en la corteza cerebral de ratón. * $P < 0.01$ (test-t de Student). Véase Figura 1 para otros detalles.

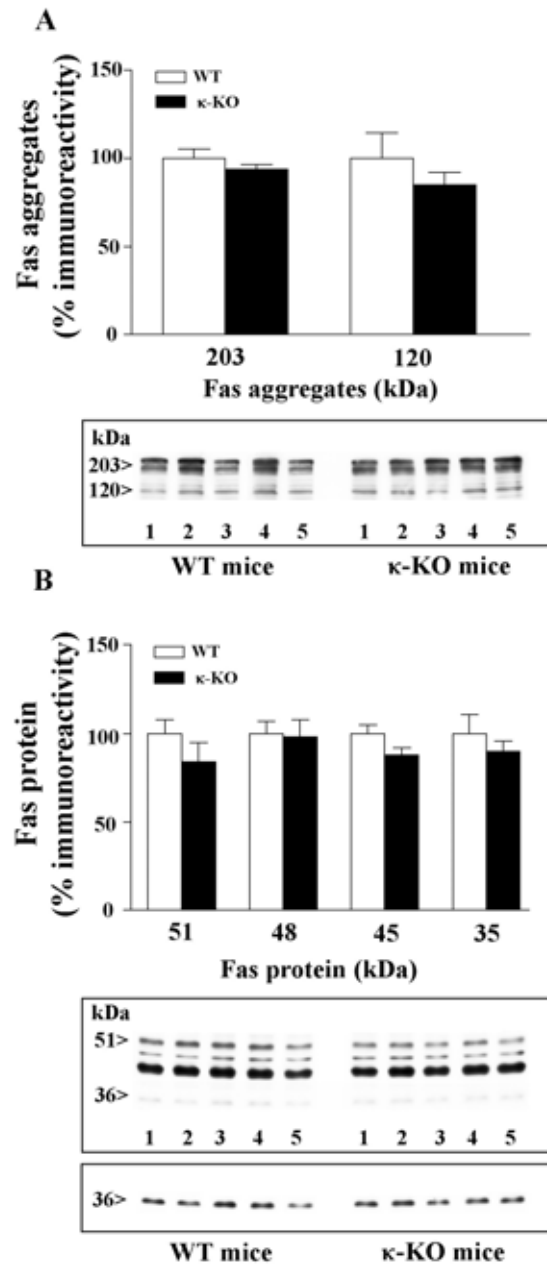


Figura 3. Efectos del genotipo receptor κ -opioide (WT versus κ -KO) sobre la inmunodensidad del receptor Fas (A: agregados de 203- y 120-kDa; B: formas glicosiladas de 51-, 48- y 45-kDa, y forma nativa de 35 kDa) en la corteza cerebral de ratón. Véase Figura 1 para otros detalles.

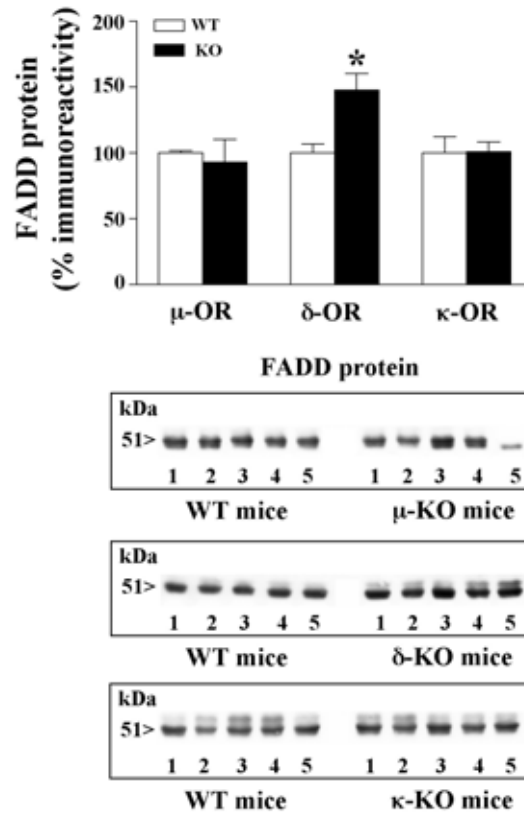


Figura 4. Efectos del genotipo receptor opioide (WT versus KO) sobre la inmunodensidad de la proteína de acople del receptor Fas, FADD (51-kDa) en la corteza cerebral de ratón. “Inmunoblots” representativos (40 μ g de proteína) de la proteína FADD en ratones WT y μ -KO, δ -KO y κ -KO tratados con solución salina (n=5 para cada grupo). *P<0.01 (test-t de Student). Véase Figura 1 para otros detalles.

ARTÍCULO V

ARTÍCULO V

Long-term regulation of signalling components of adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase in the pre-frontal cortex of human opiate addicts.

Marcel Ferrer-Alcón, M. Julia García-Fuster, Romano La Harpe, Jesús A. García-Sevilla. *Journal of Neurochemistry* 90: 220-230 (2004).

Este artículo se polarizó en la cuantificación en cerebro humano *postmortem* de adictos crónicos a opiáceos de dos vías de señalización relevantes en esta adicción, la vía clásica del AMPc y otra vía de importancia creciente como es la de MAPK ERK. Los componentes de la primera vía (AC I, PKA, tCREB y pCREB) se encontraron inalterados mientras que las formas activas (fosforiladas) de la segunda (Ras, c-Raf-1, tMEK, pMEK, tERK, pERK) se encontraron marcadamente reducidos en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos (abuso crónico). Asimismo pudo demostrarse que en cerebro de rata la administración crónica de morfina indujo una marcada reducción en la actividad de ERK1/2 (formas fosforiladas). Por último, esta investigación también demostró que en células SH-SY5Y la morfina activó ERK1/2 a través de un mecanismo dependiente de MEK1/2, ya que la inhibición de esta enzima (PD 98059) previno la activación de ERK1/2 por el opiáceo (véase también Artículo IV para la inhibición de MEK *in vivo*). En el artículo se describe que esta desregulación en la señalización de la vía de la MAPK ERK1/2 (inhibición sostenida) podría ser de relevancia en la modulación a largo plazo de varias formas de plasticidad neuronal asociadas con la adicción a opiáceos.

Long-term regulation of signalling components of adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase in the pre-frontal cortex of human opiate addicts

M. Ferrer-Alcón,* M. J. García-Fuster,*† R. La Harpe‡ and J. A. García-Sevilla*·†

*Clinical Research Unit, Department of Psychiatry, University of Geneva, Chêne-Bourg, Switzerland

†Laboratory of Neuropharmacology, Associate Unit of the Institute of Neurobiology « Ramón y Cajal » (CSIC), Department of Biology, University of the Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain

‡Institute of Forensic Medicine, University of Geneva, Genève, Switzerland

Abstract

Opiate addiction involves the development of chronic adaptive changes in μ -opioid receptors and associated pathways (e.g. cAMP signalling) which lead to neuronal plasticity in the brain. This study assessed the status of cAMP and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in brains (pre-frontal cortex) of chronic opiate addicts. In these subjects ($n = 24$), the immunodensities of adenylyl cyclase-I, PKA $C\alpha$, total and phosphorylated CREB were not different from those in sex-, age- and PMD-matched controls. Moreover, the ratio pCREB/tCREB was similar in opiate addicts (0.74) and controls (0.76), further indicating that opiate addiction in humans is not associated with an upregulation of several key components of cAMP signalling in the pre-frontal cortex. In contrast, the components of MAPK cascade (Ras/c-Raf-1/MEK/ERK) were

decreased in the same brains. Notably, pronounced down-regulations of phosphorylated MEK (85%) and ERK1/2 (pERK1: 81%; pERK2: 80%) were quantitated in brains of opiate addicts. Chronic morphine treatment in rats (10–100 mg/kg for 5 days) was also associated with decreases of pERK1/2 (59–68%) in the cortex. In SH-SY5Y cells, morphine also stimulated the activity of pERK1/2 (2.5-fold) and the MEK inhibitor PD98059 blocked this effect (90%). The abnormalities of MAPK signalling might have important consequences in the long term development of various forms of neural plasticity associated with opiate addiction in humans.

Keywords: cAMP signalling, human post-mortem brain, MAPK signalling, opiate addiction, rat brain, SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* (2004) **90**, 220–230.

Opiate addiction in humans is a chronic disorder characterized by drug tolerance and dependence, sensitization, long-term vulnerability to relapse and high mortality. The development of opiate addiction involves the establishment of chronic adaptive changes in μ -opioid receptors and associated signalling systems (e.g. cAMP pathway) leading to neuronal plasticity in specific regions of the brain, including the neocortex (Simonato 1996; Nestler and Aghajanian 1997; Law *et al.* 2000; Nestler 2001, 2002; Williams *et al.* 2001).

Chronic opiate agonist exposure has been shown to result in upregulation of cAMP signalling in the rat brain, the best established molecular adaptation to chronic morphine to date, and this compensatory response develops probably to oppose the acute opiate inhibition of the cAMP pathway (Nestler and Aghajanian 1997). In the rat locus coeruleus, this upregulation of cAMP signalling involves increased concentrations of

Gi/o proteins, adenylyl cyclases, protein kinase A (PKA) and its downstream nuclear target CREB (Nestler and Aghajanian 1997; Williams *et al.* 2001). Notably, the activity of CREB plays a relevant role in opiate addiction (Maldonado *et al.*

Received October 22, 2003; revised manuscript received January 16, 2004; accepted February 25, 2004.

Address correspondence and reprint requests to J.A. García-Sevilla, Laboratory of Neuropharmacology, Department of Biology, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca (Balears), Spain. E-mail: jesus.garcia-sevilla@uib.es

Abbreviations used: AC, adenylyl cyclase; BSA, bovine serum albumin; CREB, cAMP response element-binding protein; DMSO, dimethyl sulphoxide; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FCS, fetal calf serum; Gi/o, inhibitory coupling protein; IOD, integrated optical density; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase and ERK kinase; PBS, phosphate-buffered saline; PKA, cAMP-dependent protein kinase A; PMD, post-mortem delay; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis.

1996; Blendy and Maldonado 1998) and, in this way, chronic morphine can stimulate the expression of numerous genes through PKA-mediated CREB phosphorylation. Modulation of transcription factors such as CREB represents one potential mechanism for persisted opiate-induced plasticity in the brain (Nestler and Aghajanian 1997; Nestler 2001, 2002).

More recently, numerous investigations have also shown the involvement of MAPK pathway in the effects of opiate drugs (Law *et al.* 2000; Liu and Anand 2001; Williams *et al.* 2001), but most studies have dealt only with the modulation of the best-characterized ERK1/2 (Ortiz *et al.* 1995; Berhow *et al.* 1996; Gutstein *et al.* 1997; Schulz and Höllt 1998; Mazzucchelli *et al.* 2002; Eitan *et al.* 2003; Lesscher *et al.* 2003). The MAPK pathway is a key signalling mechanism that transduces extracellular signals to the nucleus and regulates many aspects of cellular functions (e.g. cell growth, differentiation and apoptosis) (Cobb 1999; Grewal *et al.* 1999; Pearson *et al.* 2001; Sweatt 2001). The first component of this pathway Raf-1 (a serine/threonine kinase, MAPKKK) relays the extracellular signal from the receptor/Ras (a small G protein) complex to a cascade of cytosolic kinases by phosphorylating and activating MEK (MAPKK), which in turn phosphorylates and activates (exclusively) ERK1/2 (p44 and p42 MAPK) that finally regulate various cytoplasmic (e.g. cdk5, cytoskeletal proteins) and nuclear proteins (e.g. CREB, Elk-1) to alter gene expression (Pearson *et al.* 2001; Pouyssegur and Lenormand 2003). ERK1/2 are expressed in mature neurones being the most abundant kinases in the cascade, which provides a mechanism of signal amplification (Derkinderen *et al.* 1999; Pouyssegur and Lenormand 2003) that plays a key role in various long-lasting forms of synaptic plasticity (Grewal *et al.* 1999; Sweatt 2001; Adams and Sweatt 2002; Mazzucchelli *et al.* 2002). In the context of opiate addiction, a striking increase in sensitivity to the rewarding properties of morphine (mediated by an upregulation of ERK2) has been observed in mice lacking ERK1 (Mazzucchelli *et al.* 2002).

Although several studies in laboratory animals have clearly demonstrated the involvement of cAMP and MAPK signalling pathways in the chronic effects of opiates, nothing is known about similar or dissimilar adaptive changes of these key systems in brains of human opiate addicts. This approach is particularly relevant because animal models, besides the obvious differences between animal and human brain, cannot fully reproduce the features and framework of opiate intake in humans. Therefore, the aim of this study was to evaluate in parallel the status of the various components of the cAMP (AC/PKA/CREB) and MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK) pathways in a large series of brains of well-defined chronic opiate abusers who had died of an opiate overdose. The main findings demonstrate an apparent normal functioning of cAMP signalling and the existence of a pronounced downregulation of the MAPK pathway in the pre-frontal cortex of chronic opiate addicts.

Materials and methods

Human brain samples

Brain samples were dissected at the time of autopsy (Institute of Forensic Medicine, University of Geneva, Switzerland) and immediately stored at -80°C until assay. Specimens of the right pre-frontal cortex (Brodmann's area 9) were collected from 24 well-defined chronic opiate abusers who had died of an opiate overdose. As in previous studies (Ferrer-Alc3n *et al.* 2003, 2004), the pre-frontal cortex was chosen for examination because it includes important areas functionally related to the mesolimbic dopaminergic reward system which are relevant to opiate addiction (Simonato 1996; Williams *et al.* 2001). These subjects had been used in a previous study, which revealed abnormalities in the expression of μ -opioid receptors and receptor regulatory mechanisms (Ferrer-Alc3n *et al.* 2004). Drug screening and the determination of a long-term history of opiate addiction were made as described previously (Ferrer-Alc3n *et al.* 2004). Drug screening in blood samples (Table 1) showed the presence of fatal concentrations of morphine or methadone in all opiate addicts in whom a heroin or methadone overdose was the cause of death (for further details see Ferrer-Alc3n *et al.* 2004). Moreover, the detection in hair samples (3–10 cm from the root) of 6-monoacetylmorphine (range 0.2–13 ng/mg), morphine (range 0.2–1.3 ng/mg) or methadone (range 0.4–14.2 ng/mg) indicated a chronic abuse of opiates in these subjects (6–12 months before death; Table 1; Tagliaro *et al.* 1998). Ethanol was found in blood samples of some opiate addicts (range 0.05–2.4 g/L, $n = 10$), but no evidence of a diagnosis of ethanol dependence was obtained by medical records. Other drugs detected in blood samples of these subjects (e.g. weak concentrations of cocaine; Table 1) did not appear to alter the status of the target proteins in brains of opiate addicts (see Results). Control brain specimens (right pre-frontal cortex) were obtained at autopsy from potential healthy subjects dying in the same period and who met specific criteria to match the opiate addicts (including a negative toxicological screening), as described previously (Ferrer-Alc3n *et al.* 2004). Ethanol was detected in some control subjects (range 0.05–2.02 g/L, $n = 6$), but also in these cases no evidence of a diagnosis of ethanol dependence was obtained. The control group consisted of specimens from 18 subjects with an age at death (mean \pm SEM: 33 ± 2 years) and a post-mortem delay (PMD: 34 ± 4 h) that did not differ from those in opiate addicts (Table 1). The influence of PMD (range 2–62 h) and age (range 18–50 years) on MAPK signalling components in the brain was assessed in a similar group of control subjects (see Results). These variables did not alter the expression of AC-1 in the human brain (data not shown). The influence of age (15–52 years) and PMD (3–81 h) on other components of cAMP signalling (PKA, CREB, pCREB) had been assessed with negative results in a previous study (Odagaki *et al.* 2001). The definitive pairs of subjects (opiate addicts and their respective matched controls) are given in Table 1. This study was approved by the research and ethical review board of the Department of Psychiatry, University of Geneva.

Opiate drug treatment of rats and brain samples

Male Sprague–Dawley rats (250–300 g) were used. The animals were housed under controlled environmental conditions (22°C, 70% humidity, and 12-h light/dark cycle) with free access to food and

Table 1 Demographic characteristics and toxicological data of individual opiate addicts

Sex/Age* (years)	PMD (h)	Total blood opiates ($\mu\text{g/mL}$)	Other drugs ($\mu\text{g/mL}$) Ethanol (g/L)	Hair opiates (ng/mg)
M/18 (M/20)	21 (35)	Met (1.1)	Chl (1.5) + Qua (0.2)	Met (0.4) + MAM (4.8)
M/19 (M/20)	26 (35)	Mor (0.2)	None	NT
M/23 (M/15)	66 (70)	Mor (1.7)	None	NT
M/23 (M/15)	55 (70)	Met (1.5)	Thio (1.4)	Mor (0.4) + MAM (2.2)
M/39 (M/40)	56 (48)	Mor (1.1)	Eth (2.4)	MAM (2.5)
M/30 (M/37)	60 (48)	Mor (1.5)	None	MAM (1.2)
M/25 (M/23)	41 (38)	Met (0.7)	None	NT
M/25 (M/20)	26 (35)	Mor (1.1)	Eth (0.4)	MAM (0.9)
M/26 (M/28)	44 (36)	Mor (0.3) + Cod (3.6)	Eth (0.05)	Mor (0.3) + MAM (1.3)
M/25 (M/28)	50 (36)	Met (0.5)	Coc (0.05)	Mor (0.4) + MAM (1.1)
M/26 (F/34)	73 (67)	Mor (1.7)	Coc (0.04)	Mor (1.3) + MAM (13.0)
M/23 (M/31)	52 (62)	Met (1.3)	Eth (0.06)	Met (0.5) + MAM (0.2)
M/29 (M/22)	25 16	Met (0.5)	Cit (3.4)	Met (1.1)
M/26 (M/27)	20 22	Met (0.3)	Eth (0.12)	Met (0.6)
M/26 (M/27)	13 22	Mor (2.0)	Eth (0.28)	MAM (0.4) + Met (4.0)
M/40 (M/48)	16 24	Met (0.8)	Qui (1.2)	Met (0.8)
M/33 (M/40)	16 24	Mor (1.5)	Eth (0.87)	MAM (0.4) + Met (14.2)
M/44 (M/44)	19 19	Mor (0.6)	None	Mor (0.2)
M/32 (M/36)	29 29	Mor (1.6) + Cod (0.5)	Eth (0.15)	Mor (0.7) + Coc (1.0)
M/42 (M/44)	28 19	Met (0.4)	None	Met (13.5)
M/42 (F/50)	18 10	Mor (0.8)	Eth (1.64)	Mor (0.4)
M/46 (F/50)	13 10	Mor (0.8)	Coc (0.2)	Mor (0.2) + Coc (6.5)
F/28 (M/23)	13 17	Met (1.4)	Coc (0.02)	Met (4.7) + Coc (0.9)
M/29 (M/35)	38 29	Met (0.4)	Eth (0.36)	Met (1.3) + Mor (0.8)
Addict group				
23M/1F	34 \pm 4 h	Mor (1.2 \pm 0.2, $n = 13$)		
30 \pm 2 years		Met (0.8 \pm 0.1, $n = 11$)		

*Data of the respective matched control subject presented in parentheses. PMD, post-mortem delay (time period from death to the storage of the brain specimen). NT: not tested. Cause of death for all opioid addicts was an overdose of heroin [detection of 6-monoacetylmorphine (MAM) and free morphine (Mor) in blood] or methadone (Met, detection of Met and its metabolite 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidone in blood). Quantitative determinations of opiate drugs and other drugs in blood and hair samples were performed as indicated in Materials and methods. Chl, chloroquine; Cit, citalopram; Coc, cocaine; Cod, codeine; Eth, ethanol; Qua, methaqualone; Qui, quinine; Thio, thioridazine. Some subjects were also positive for benzodiazepines and cannabinoids in urine specimens.

water. For the acute treatment, the rats received a single intraperitoneal (i.p.) injection of morphine (30 mg/kg i.p. for 2 h). For the chronic treatment with morphine, the rats were injected i.p. three times daily (at 08:00, 14:00 and 20:00 h) during 5 days with increasing doses of the opiate (10–100 mg/kg; Ventayol *et al.* 1997), and the animals were killed 2 h after the last dose of morphine. These morphine treatments in rats were well-tolerated and no lethality was observed. Control rats received 0.9% saline vehicle (1 mL/kg i.p. for 2 h). The rats were killed by decapitation and specimens of cerebral cortex were dissected and stored at -80°C until use. These experiments in rats were performed according to the guidelines of the University of the Balearic Islands, Spain.

SH-SY5Y cell culture, induction of ERK activity by morphine and cell lysates

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells (a SK-N-SH cell clone which expresses high densities of μ - and δ -opioid receptors, proportion 4 : 1; Yu *et al.* 1986) were grown in monolayer (incubator at 37°C and 5% $\text{CO}_2/95\%$ humidified air) in RPMI-1640 medium

supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin. Cells were passaged every 4 days. Confluent cells were released in DPBS (150 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 3 mM KCL, 7.9 mM Na_2HPO_4 , 0.1 mM EDTA, pH 7.4), centrifuged (300 g, 5 min), resuspended in RPMI-1640 medium and counted. To assess the induction of ERK activity (pERK1/2) by morphine, aliquots of SH-SY5Y cells were exposed to various morphine concentrations (1 nM–100 μM for 5 min) or to the chosen 1 μM morphine for 1–60 min (time-course experiments). To block the basal activation of ERK1/2 by MEK and the stimulatory effect of morphine on the former enzyme isoforms, cells were also pre-incubated with PD98059 (2-amino-3-methoxyflavone, 50 and 100 μM), a selective inhibitor of MEK (Alessi *et al.* 1995), or vehicle control (0.1% dimethyl sulphoxide, DMSO), for 60 min prior to basal assessment or drug stimulation. Drug-treated and control SH-SY5Y cells were finally resuspended in homogenization buffer and cell lysates prepared as for the brain samples (see below). For these *in vitro* experiments, freshly prepared membrane homogenates were used.

Human and rat brain sample preparations and immunoblot assays

Target proteins in the brain were assessed by quantitative immunoblotting as described previously (Ferrer-Alcón *et al.* 2003, 2004). Briefly, 200–250 mg of human pre-frontal cortex was homogenized in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 6.8, containing 1 mM EDTA, 2% sodium dodecyl sulphate (SDS) and various protease inhibitors (1.3 mM pepabloc, 10 µg/mL leupeptin, 5 µg/mL E64, 10 µg/mL antipain and 10 µg/mL pepstatin A). Aliquots of this mixture were combined with solubilization loading buffer [50 mM Tris–HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 2.5% β-mercaptoethanol and 0.1% bromophenol blue] to reach a final protein concentration of 3 µg/µL. The mixtures were denatured at 95°C for 5 min and stored at –80°C. For the rat brain, 80–100 mg of cerebral cortex was homogenized in 40 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, containing 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, and the protease inhibitors phenylmethyl-sulphonyl fluoride (1 mM) and leupeptin (40 µg/mL). The samples were centrifuged at 40 000 *g* for 45 min and aliquots of the resulting supernatant were mixed with loading buffer as above. Then the samples were denatured and stored at –80°C until use. Protein concentrations were determined by the biuret reaction using bicinchoninic acid for colorimetric detection of cuprous cation (BCA, Protein Assay Reagent, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA).

In routine experiments, 40 µg protein of each human or rat brain sample (total homogenate) or SH-SY5Y cell lysate was subjected to SDS–PAGE on 15-well 12% polyacrylamide minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated (blocking solution) in phosphate-buffered saline containing 5% non-fat dry milk, 0.2% Tween-20, and 0.5% bovine serum albumin (BSA) or 0.5% Tween and 3% BSA (for PKA, tCREB and pCREB; Odagaki *et al.* 2001). Then, the membranes were incubated (overnight at 4°C) in blocking solution containing the appropriate primary antibody. The following primary polyclonal (affinity-purified) or monoclonal antibodies were used: AC-I (anti-A cyclase I, Product sc-586, 1 : 1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); PKA (anti-PKA C α catalytic subunit, Product sc-903, 1 : 100 000 dilution, Santa Cruz Biotechnology); CREB (antitotal CREB, Product 06–863, 1 : 5000 dilution, Upstate Biotechnology, New York, NY, USA); phosphorylated CREB (antiphospho-CREB, p⁺Ser 133, Product 06–519, 1 : 5000 dilution, Upstate Biotechnology); Ras (anti-Ras, Product R02120, 1 : 1000 dilution, Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA); c-Raf-1 (anti-Raf, Product R19120, dilution 1 : 1000, Transduction Laboratories); MEK (antitotal MEK1/2, Product 9120 Antibody Kit, 1 : 3000 dilution, New England Biolabs, Beverly, MA, USA); phosphorylated MEK (antiphospho MEK1/2, p⁺Ser 217/221, Product 9120 Antibody Kit, 1 : 1000 dilution, New England Biolabs); phosphorylated MEK (antiphospho MEK1/2, p⁺Ser 217/221, Product 9121, 1 : 1000 dilution, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA); ERK (antitotal ERK1/2, Product 442704, 1 : 1000 dilution, Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, CA, USA); phosphorylated ERK (antiphospho ERK1/2, p⁺Tyr 204, Product 442705, 1 : 1000 dilution, Calbiochem); phosphorylated ERK (antiphospho ERK1/2, p⁺Thr 202/p⁺Tyr 204, Product 9106S, 1 : 1000 dilution, New England Biolabs), and anti α -internexin (Product AB1515, 1 : 1000 dilution, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA). For CREB,

MEK and ERK the samples were first analysed with antiphospho-protein antibodies (active forms) and then stripped and reprobed with antitotal-protein antibodies. The secondary antibody was horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG or sheep anti-mouse IgG (1 : 5000 dilution). Bound antibody (immunoreactivity) was detected using the enhanced chemiluminescence (ECL) western blot detection system (Amersham, Buckinghamshire, UK) and visualized by exposure to autoradiographic film (Amersham ECL Hyperfilm) for 1–15 min (autoradiograms).

Quantitation of target protein contents

The autoradiograms were quantitated by densitometric scanning (GS-700 Imaging Densitometer, resolution: 42 µm, Bio-Rad), by measuring the integrated optical density (IOD) units of the immunoreactive bands. In a given experiment, the amount of a target protein in the pre-frontal cortex of one or two opiate addicts was compared with that of a control subject matched for age (\pm 8 years), PMD (\pm 15 h), and whenever possible for sex, and these subjects were run together on the same gel. Prior to analyses, the linearity of protein concentration for western blotting was ascertained by resolution of selected concentrations of protein (i.e. total protein loaded versus IOD units, consisting of 5 points of different protein content, usually 20–60 µg, resulting in good linear relations; data not shown). Experiments in opiate addicts and matched controls were performed by using a protein concentration (40 µg in duplicate) known to be within the linear range for immunolabeling of the target proteins. This quantification procedure was assessed three to five times in different gels. Finally, percentage changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each opiate addict in each gel, and the mean value of the different gels was used as a final estimate. Similarly, the content of ERK (total and phosphorylated) in the cerebral cortex of rats treated with morphine was compared in the same gel with that of control rats which received saline solution. The quantification procedure was assessed three times in different gels. Finally, percentage changes in immunoreactivity with respect to control saline samples (100%) were calculated for each rat treated with morphine in the various gels and the mean value used as a final estimate. A similar procedure was used to quantitate the effect of morphine on ERK activity in SH-SY5Y cells.

Data analysis and statistics

Results are expressed as mean \pm SEM. The two-tailed one-sample *t*-test (human data), one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (rat data) and Student's *t*-test (SH-SY5Y cell data) were used for the statistical evaluations. Pearson's correlation coefficients were calculated by the method of least squares to test for possible association among variables. The level of significance was chosen at $p = 0.05$.

Reagents

The SH-SY5Y cell line was kindly provided by Dr Beat M. Riederer (IBCM, University of Lausanne, Switzerland). RPMI-1640 medium was purchased from Gibco BRL (Basel, Switzerland). Morphine HCl was from Unión-Químico-Farmacéutica S.A.E. (Madrid, Spain). PD98059 (2-amino-3-methoxyflavone) was from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Acrylamide (Protogel) was from BDH Brunschwig (Dorset, UK), Pepabloc from Boehringer (Rotkreuz,

Switzerland) and nitrocellulose membranes from Schleicher & Schuell (Dassel, Germany). Other materials such as horseradish peroxidase-linked secondary antibody, ECL reagents, and autoradiography films were purchased from Amersham. All other chemicals were from Sigma Chemie or Fluka Chemie (Buchs, Switzerland).

Results

Long-term regulation of AC/PKA/CREB pathway in brains of opiate addicts

In the pre-frontal cortex of opiate addicts ($n = 24$), the immunodensities of AC-I ($95 \pm 11\%$), PKA $C\alpha$ ($99 \pm 6\%$), total content of CREB ($95 \pm 2\%$) and phosphorylated CREB ($105 \pm 7\%$; the active form of this transcription factor by phosphorylation at the activator-site residue Ser 133) were not significantly different from those in sex-, age-, and PMD-matched controls (100%) (Fig. 1). In these brains the ratio pCREB/tCREB was similar to that in control subjects

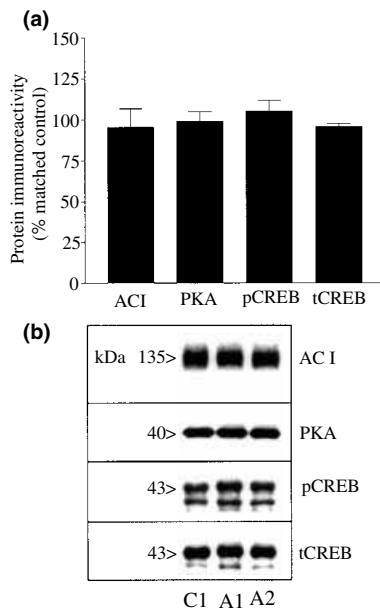


Fig. 1 (a) Immunodensities of adenylyl cyclase type I (AC-I), protein kinase A $C\alpha$ (PKA), total cAMP response element-binding protein (tCREB) and phosphorylated CREB (pCREB) in the pre-frontal cortex (Brodman area 9) of chronic opiate addicts as mean \pm SEM (bars) percentages ($n = 24$) of the contents in matched controls. (b) Representative immunoblots for the various cAMP signalling components in the pre-frontal cortex of two opiate addicts (A1, heroin overdose: 44-year-old man; PMD: 19 h; A2, methadone overdose: 42-year-old man; PMD: 28 h) and the matched control subject (C1, 44-year-old man; PMD: 19 h). The amount of total protein loaded per gel well was $40 \mu\text{g}$ in all cases. The apparent molecular masses of these proteins were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left hand side. Note that in A1, but not in A2, the immunoreactivities of PKA and pCREB were increased (45%).

(controls: 0.76 ± 0.06 , $n = 12$; addicts: 0.74 ± 0.04 , $n = 24$; Fig. 2a), further indicating that the content of the active form of CREB is not altered in chronic opiate addicts. As would be expected, however, the immunodensities of PKA showed a positive and significant correlation with those of pCREB ($r = 0.72$, $n = 24$, $p < 0.0001$), but not of tCREB ($r = 0.18$, $n = 24$, $p > 0.05$), in the same brains of opiate addicts (Figs 2b and c), which indicated the existence of a close relation between the activation of PKA ($C\alpha$ catalytic subunit) and the phosphorylation of CREB in the human brain.

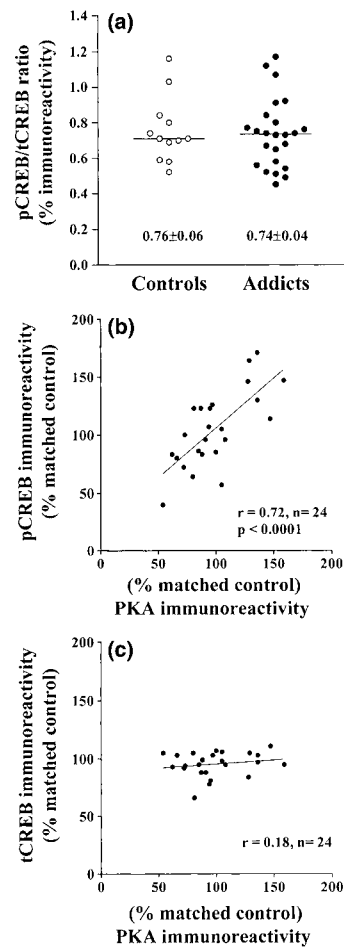


Fig. 2 (a) Ratios of phosphorylated CREB to total CREB (pCREB/tCREB) immunoreactivity in the pre-frontal cortex of control subjects and opiate addicts. Each circle is the ratio for a given subject. The line represents the mean value of each group (controls, $n = 12$; addicts, $n = 24$). (b, c) Scatterplots depicting the significant correlation between the immunodensities of protein kinase A $C\alpha$ (PKA) and pCREB (b) or the lack of correlation between PKA and tCREB in the pre-frontal cortex (same samples) of opiate addicts. Each circle represents a different subject ($n = 24$). The solid lines are the regression of the correlations. Both axes are expressed as percentages of immunoreactivity in matched control subjects.

Similar negative results for the contents of AC/PKA/CREB were also obtained in the pre-frontal cortex of drug-free opiate addicts (no drugs other than opiates detected, $n = 16$; data not shown). Variables such as heroin or methadone overdose, plasma concentrations of opiates and presence of ethanol or other drugs (e.g. cocaine) in blood samples did not alter significantly the components of cAMP signalling pathway in brains of opiate addicts (data not shown).

Long-term regulation of Ras/Raf/MEK/ERK pathway in brains of opiate addicts

In initial studies, the influence of PMD and age on MAPK signalling components (Ras/Raf/MEK/ERK) was assessed to determine the pattern of degradation of these proteins and the effect of ageing. In brains (pre-frontal cortex) of control subjects, the PMD (range 2–62 h) and the age of subjects at death (range 18–50 years) did not alter the immunodensities of Ras, c-Raf-1 and total contents of MEK and ERK (data not shown; see Fig. 3 for tERK1/2). In the same brains, however, the immunodensities of phosphorylated MEK (p⁺Ser 217/221) and ERK1/2 (p⁺Tyr 204), the active forms of these enzymes, showed a marked decline with PMDs greater than 30 h (Fig. 3 for pERK1/2). Therefore, the components of the MAPK pathway were quantitated in a subset of opiate addicts (PMD: 21 ± 2 h; age: 32 ± 3 years, $n = 12$) that were matched with the appropriate control subjects (PMD: 23 ± 3 h; age: 34 ± 4 years, $n = 12$).

In the pre-frontal cortex of opiate addicts ($n = 12$), the immunodensities of Ras ($96 \pm 5\%$), c-Raf-1 ($84 \pm 6\%$, $p < 0.05$), tMEK ($88 \pm 2\%$, $p < 0.05$), pMEK ($15 \pm 7\%$,

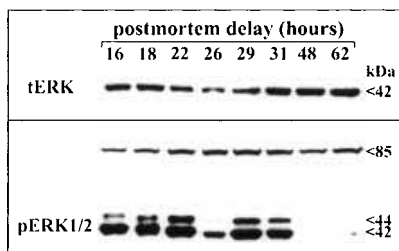


Fig. 3 Immunoblots for the effect of post-mortem delay (PMD: 16–62 h) on the immunoreactivity of total extracellular signal-regulated kinases (tERK) and phosphorylated ERK (pERK1/2, or MAPK: p44/42 MAP kinases) in the human pre-frontal cortex (eight healthy subjects). The amount of total protein loaded per gel well was 40 μ g for all subjects which were run in the same gel. The apparent molecular masses of various forms of ERK were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the right hand side. Note that PMDs greater than 31 h were associated with marked reductions (> 90%) in the content of pERK1/2 but not tERK. The antiphospho-ERK antibody (Calbiochem) used also immunodetected an unidentified 85 kDa peptide which was not affected by the length of PMD (internal control).

$p < 0.001$), tERK ($100 \pm 1\%$), and their active forms pERK1 ($19 \pm 6\%$, $p < 0.001$) and pERK2 ($20 \pm 7\%$, $p < 0.001$) were, in general, decreased compared with those in sex-, age- and PMD-matched controls (100%; Fig. 4). Notably, marked downregulations in the contents of active phosphorylated MEK (p⁺Ser217/221; 85%) and ERK (p⁺Tyr204; pERK 1 : 81%; pERK 2 : 80%) were observed in brains of chronic opiate addicts (Fig. 4). Similar results were obtained when the activities of ERK1/2 were quantitated with a different antibody that recognizes dually phosphorylated ERK (p⁺Thr202/p⁺Tyr204) by MEK (New England Biolabs; pERK1 : $77 \pm 7\%$ decrease, $p < 0.001$; pERK2 : $75 \pm 8\%$ decrease, $p < 0.001$, $n = 6$). It is of interest to note that the immunodensity of an unidentified peptide of ~ 85 kDa, detected with the antiphospho-ERK antibody (Calbiochem)

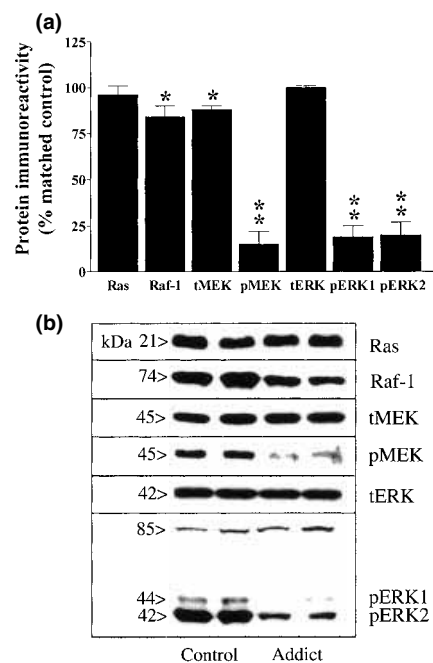


Fig. 4 (a) Immunodensities of Ras, Raf-1 (MAPKKK), total and phosphorylated MEK (tMEK, pMEK, or MAPKK) and total and phosphorylated extracellular signal-regulated kinases (tERK, pERK1/2, or MAPK: p44/42 MAP kinases) in the pre-frontal cortex (Brodmann area 9) of chronic opiate addicts as mean \pm SEM (bars) percentages ($n = 12$) of the contents in matched controls. (b) Representative immunoblots for the various MAP kinase signalling components in the pre-frontal cortex of one opiate addicts (26-year-old man; PMD: 20 h) and the matched control subject (27-year-old man; PMD: 22 h). The amount of total protein loaded per gel well was 40 μ g (in duplicate) in all cases. The apparent molecular masses of these proteins were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left hand side. Note that in the opiate addict the immunoreactivities of Raf-1, pMEK and pERK1/2 were decreased (40–82%). The antiphospho-ERK antibody (Calbiochem) used also immunodetected an unidentified 85 kDa peptide which was not reduced in the opiate addict (internal control).

and used as an internal control, was not altered in the same brains of opiate addicts ($92 \pm 9\%$, $n = 12$) compared with controls (100%; Fig. 4b). The basal activity of pERK2 (immunoreactivity) was much higher than that of pERK1, indicating that ERK2 is the predominant isoform in the prefrontal cortex of the human brain (Fig. 4b).

The marked downregulation of pMEK and pERK1/2 was also observed in brains of drug-free opiate addicts (no drugs other than opiates detected, $n = 8$; data not shown). Variables such as heroin or methadone overdose, plasma concentrations of opiates or other drugs (e.g. cocaine) in blood samples did not alter significantly the opiate-induced decreases in MAPK components in brains of opiate addicts (data not shown). The content of pERK2 in ethanol-free opiate addicts ($18 \pm 9\%$, $n = 6$) was not different from that quantitated in subjects with ethanol in blood samples ($20 \pm 9\%$, $n = 6$). Similarly, intermittent chronic ethanol exposure in rats has been shown not to alter the content of pERK2 in the frontal cortex (Sanna *et al.* 2002). In brains of opiate addicts, the immunodensity of α -internexin (a neuronal marker used as a negative control) was found unaltered ($99 \pm 6\%$, $n = 24$) compared with that in matched control subjects (100%; Ferrer-Alcón *et al.* 2004), which discounted possible effects of unspecific variables or non-specific effects of other drugs on AC and MAP kinase signalling pathways.

In vivo effects of morphine on ERK activity in the rat brain

Many G protein-coupled receptors, including the μ -opioid receptor, can effectively stimulate ERK (Van Biesen *et al.* 1996). Therefore, the acute and chronic effects of morphine on ERK activity were also investigated in the rat brain to assess whether the observed downregulation of pERK1/2 in brains of opiate addicts is a long-term effect of the abused opiates or the final acute effect of the deadly opiate overdose.

The acute treatment of rats with morphine (30 mg/kg, i.p. for 2 h), compared with saline administration, increased the immunodensity of pERK1 ($88 \pm 30\%$, $n = 5$, $p < 0.05$) and pERK2 ($102 \pm 23\%$, $n = 5$, $p < 0.01$), but not that of tERK, in the cerebral cortex (Fig. 5). In contrast, chronic treatment with morphine (10–100 mg/kg for 5 days) was associated with decreases in the contents of pERK1 ($68 \pm 5\%$, $n = 6$, $p < 0.05$), pERK2 ($59 \pm 5\%$, $n = 6$, $p < 0.05$) and tERK ($19 \pm 5\%$, $n = 6$, $p < 0.05$) in the rat brain (Fig. 5). Acute and chronic morphine did not modify significantly the immunodensity of a 85 kDa unidentified peptide (see above) in the rat brain (Fig. 5b).

In vitro effects of morphine on the induction of ERK activity in SH-SY5Y cells: blockade by the MEK inhibitor PD98059

To assess the mechanism by which morphine stimulates ERK, various *in vitro* experiments were performed in human neuroblastoma SH-SY5Y cells which are enriched in

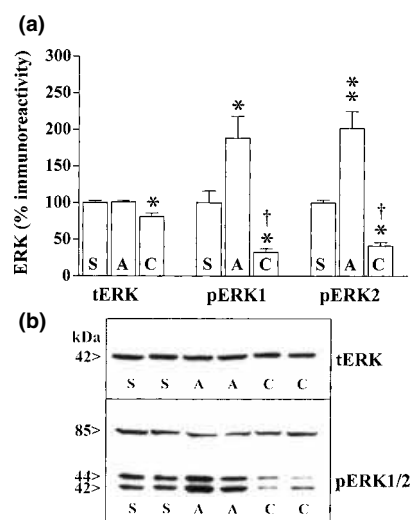


Fig. 5 Effects of acute (A, 30 mg/kg, i.p., 2 h) and chronic morphine (C, 10–100 mg/kg for 5 days) treatments on the immunodensities of total and phosphorylated extracellular signal-regulated kinases (tERK, pERK1/2, or MAPK: p44/42 MAP kinases) in rat brain (cerebral cortex). (a) Columns are means \pm SEM of 4–6 experiments per group with an animal per experiment, and expressed as percentage of saline-treated rats (S). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when compared with the corresponding saline group; † $p < 0.001$ when compared with the corresponding acute effect of morphine (ANOVA followed by Bonferroni's test). (b) Representative immunoblots for the effect of acute (A) and chronic (C) morphine on tERK and pERK1/2 in the cerebral cortex. The apparent molecular masses of the various forms of ERK were determined by calibrating the blots with prestained molecular weight markers as shown on the left hand side. The antiphospho-ERK antibody (Calbiochem) used also immunodetected an unidentified 85 kDa peptide which was not modulated by morphine treatment (internal control).

μ -opioid receptors. In SH-SY5Y cells, morphine rapidly stimulated the phosphorylation of ERK1/2 in a concentration-dependent (1 nM–100 μ M; data not shown) and time-dependent (1–60 min) manner (1.5–3.5-fold induction, $p < 0.05$), without altering the immunodensity of total ERK (Fig. 6a). With 1 μ M morphine a significant increase of pERK1/2 was detected within 3 min, reached a peak at 30 min and then declined by 60 min (Fig. 6a).

Incubation (60 min) of SH-SY5Y cells with 100 μ M PD98059 (a specific MEK inhibitor) almost completely abolished the expression of pERK1/2 (84–93%; Fig. 6b), which indicated that the basal activation of ERK is dependent on MEK activity (the only way in which ERK is activated by MEK-induced phosphorylation). Moreover, pre-incubation of SH-SY5Y cells with 50 μ M PD98059 (60 min), a concentration that apparently did not alter the immunodensity of pERK1/2, markedly attenuated morphine (1 μ M, 5 min)-induced activation of ERK1/2 (35–60%; Fig. 6b). Cell pre-incubation with 100 μ M PD98059 completely blocked the stimulatory effect of morphine on pERK1/2

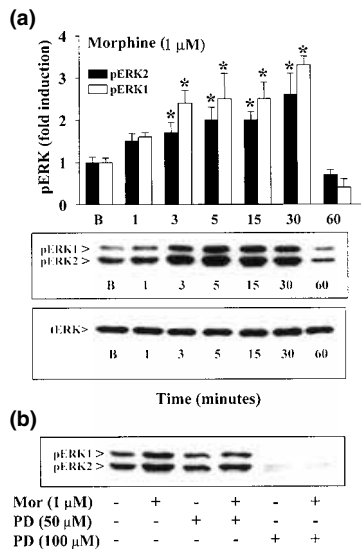


Fig. 6 (a) Time course (1–60 min) and the effect of morphine (1 μM) on the immunodensities of phosphorylated and total extracellular signal-regulated kinases (pERK1/2, tERK or MAPK: p44/42 MAP kinases) in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *at least $p < 0.05$ when compared with basal values (B; Student's t -test). (b) Effects of the MEK (MAPKK) inhibitor PD98059 (PD, 50 and 100 μM for 60 min) on the basal activity of pERK1/2 and morphine (1 μM for 5 min)-induced activation of pERK1/2 in SH-SY5Y cells.

(88–96%; Fig. 6b), ruling out the possibility that the activation of ERK1/2 signalling by morphine might be caused by a MEK-independent pathway.

Discussion

The main results of this study demonstrate that chronic opiate addiction in humans is associated with an apparent normal functioning of several cAMP-signalling components (AC-I/PKA Cα/total and phosphorylated CREB) and a marked downregulation of key active enzyme forms of MAPK pathway (phosphorylated MEK and ERK) in the pre-frontal cortex, a brain region related to the mesolimbic dopaminergic reward system. This abnormality in MAPK signalling (decreased activation of ERK1/2) might be relevant in modulating long-lasting forms of synaptic plasticity in opiate addiction (Nestler 2001, 2002; Mazzucchelli *et al.* 2002).

Studies examining the effects of opiate drugs on cAMP signalling have produced mixed results (Liu and Anand 2001; Williams *et al.* 2001) but, in general, chronic morphine treatment has been associated with a compensatory upregulation of this system in specific regions of the rat brain. Thus, Gαi/o proteins (Lane-Ladd *et al.* 1997), AC activity (Duman *et al.* 1988; Lane-Ladd *et al.* 1997), PKA Cα (Lane-Ladd *et al.* 1997), CREB protein and the extent of CREB phosphorylation (Guitart *et al.* 1992; Widnell *et al.* 1994) were shown to be increased in the rat locus coeruleus after

chronic morphine and/or opiate withdrawal. A modest enhancement of some of these components or even downregulation of CREB were also reported in other brain regions, such as the limbic system and corpus striatum of rats (see Widnell *et al.* 1996). In contrast, opiate addiction in wild-type mice, similarly to the human brain (current results), did not result in a sustained activation of cAMP signalling in the brain (Gαi1/2 proteins, PKA, pCREB; García-Sevilla *et al.* 2004). Moreover, the increases in AC activity and cAMP content induced by chronic morphine treatment were very modest, even after opiate withdrawal, in the mouse cerebral cortex (about 10%; Maldonado *et al.* 1996; Mamiya *et al.* 2001). Similarly, chronic morphine also failed to increase PKA Cα in the locus coeruleus of mice (Akbarian *et al.* 2002). It is of interest to note that the highest densities of CREB (and its active form by phosphorylation at the activator-site residue Ser133) have been quantitated in the corpus striatum and cerebral cortex (Blom *et al.* 2002). Earlier pharmacological data indicated that acute morphine treatment was associated with a decrease in the content of pCREB in the rat locus coeruleus (Guitart *et al.* 1992), although this study did not measure directly CREB phosphorylation on Ser133. More recently, morphine and the δ-agonist [D-Pen^{2,5}]-enkephalin have been shown to increase markedly the phosphorylation of CREB on Ser133 in NG108-15 cells (Bilecki *et al.* 2000). In primary cultures of rat striatum, however, acute and chronic morphine did not alter CREB (total protein content and protein phosphorylation), and naloxone-precipitated opiate withdrawal modestly enhanced the activity (phosphorylation state) of this transcription factor (Chartoff *et al.* 2003). Therefore, opiate treatments and/or opiate withdrawal might be associated with the activation of CREB in some neural cells and in rat brain tissue. In morphine-dependent mice, however, pCREB was not upregulated in the cerebral cortex (García-Sevilla *et al.* 2004) and a very modest induction of the nuclear cAMP response elements (CREs) was observed in various brain regions (including the cortex), whereas a robust CRE upregulation was induced by opiate withdrawal (Shaw-Lutchman *et al.* 2002).

Chronic opiate addiction in humans does not appear to be associated with an upregulation of several key components of cAMP signalling (AC-I/PKA Cα/pCREB) in the pre-frontal cortex (see Results for other experimental details). As mentioned, similar negative results were obtained in the mouse brain (García-Sevilla *et al.* 2004). This apparent lack of upregulation of cAMP pathway after long-term opiate exposure might be related to species sensitivity (human and mouse vs. rat) and/or differences in brain regions (greater cellular heterogeneity in the cortex), but MAPK signalling (current results) and other relevant markers of opiate addiction (Ferrer-Alcón *et al.* 2003, 2004) were clearly modulated in the pre-frontal cortex of the same opiate addicts. A recent study reported that AC-I is decreased in

temporal cortex, but not in nucleus accumbens, from brains ($n = 8$) of heroin addicts (Shichinohe *et al.* 2001), suggesting that this enzyme may be differentially regulated in different brain areas in opiate addiction. Alternatively, the apparent normalization of cAMP signalling in brains of chronic opiate addicts (current results) may suggest that this system (perhaps after an initial upregulation) has achieved a new steady-state in which the opioid receptor signalling through this pathway is normosensitive [e.g. in the pre-frontal cortex of opiate addicts a normal stimulation of [35 S]-GTP γ S binding by the μ -agonist DAMGO (Meana *et al.* 2000) and an increased density of G α i/o proteins (Escriba *et al.* 1994) have been observed].

In marked contrast to the cAMP pathway, the current results also demonstrate that opiate addiction in humans is associated with decreased immunodensities of the main components of MAPK cascade (c-Raf-1/pMEK/pERK) in the brain (pre-frontal cortex). The pronounced downregulation of pERK1/2 in brains of opiate addicts (75–80%) was also observed in brains of chronic morphine-treated rats (60–70%). Moreover, these opiate effects were dependent on MEK activity, because a specific MEK inhibitor (PD98059) blocked the stimulatory effect of morphine on pERK1/2 in SH-SY5Y cells. These findings are in line with previous observations indicating that MAPKs are involved in μ/δ -opioid receptor signalling in the brain (Ortiz *et al.* 1995; Berhow *et al.* 1996; Gutstein *et al.* 1997; Schulz and Höllt 1998; Eitan *et al.* 2003; Lesscher *et al.* 2003), the acute activation of pERK1/2 being mediated by G α o inhibitory proteins (Zhang *et al.* 2003). In a recent immunohistochemical study (Eitan *et al.* 2003), acute morphine treatment in mice (10–100 mg/kg) resulted in increases in pERK1/2 in the locus coeruleus and projecting areas in the neocortex (e.g. anterior cingulate cortex), and in decreases of these pMAPKs in the nucleus accumbens and central amygdala, demonstrating brain region-specific mechanisms regulating the activation of these enzymes after the acute opiate. Chronic morphine treatment (10–40 mg/kg for 6 days) resulted in tolerance to opiate-induced pERK1/2 modulation (Eitan *et al.* 2003). Because opiate addicts died of an opiate overdose (heroin or methadone), the observed downregulation of pMEK/pERK1/2 could be related, in part, to the deadly overdose which would mimic an acute effect of the opiate. However, the acute treatment of rats with morphine was associated with upregulation of pERK1/2 (twofold), with no change in the content of tERK, in the cerebral cortex. It therefore appears that, in spite of the possible stimulating effect of the final deadly opiate overdose, the potentially repressed activation of pMEK and pERK1/2 in brains of opiate addicts (pre-frontal cortex) is the net result of a chronic opiate effect (see Schulz and Höllt 1998).

The ERK cascade by co-ordinating responses to cell surface receptors and neuronal second messengers appears to play a key role in various long-lasting forms of synaptic

plasticity in the brain (Derkinderen *et al.* 1999; Grewal *et al.* 1999; Sweatt 2001; Adams and Sweatt 2002; Mazzucchelli *et al.* 2002; Pouysségur and Lenormand 2003). Therefore, the observed downregulation of pMEK/pERK1/2 could be of relevance in modulating the development of the neural plasticity associated with opiate addiction in humans. In this context, the effects of ERK1/2 on two downstream targets are of special interest: the induction of phosphorylation of neurofilament (NF-H, NF-M) proteins (Veeranna *et al.* 1998) and the activation of p35, the neuron specific activator of cyclin-dependent kinase-5 (cdk5; Harada *et al.* 2001), which in turn also phosphorylates NF proteins (Pant *et al.* 1997; Grant *et al.* 2001). Moreover, cdk5 and ERK1/2 were shown to form multimeric complexes with NF proteins in the brain (Veeranna *et al.* 2000), as they assemble the functional architecture of the mature neurone. It is of special relevance that in brains of opiate addicts the content of phosphorylated NF-H was increased, as well as the ratio of phosphorylated to non-phosphorylated NF-H forms (Ferrer-Alcón *et al.* 2000, 2003). Moreover, a marked downregulation of the cdk5/p35 complex and a positive correlation between p35 and phosphorylated NF-H were also observed in the pre-frontal cortex of opiate addicts (Ferrer-Alcón *et al.* 2003). Therefore, chronic opiate addiction in humans is associated with sustained downregulations of ERK1/2 activity (current results), cdk5/p35 complex (Ferrer-Alcón *et al.* 2003) and non-phosphorylated NF (NF-H, NF-L) proteins (Ferrer-Alcón *et al.* 2000), as well as with aberrant hyperphosphorylation of NF-H (Ferrer-Alcón *et al.* 2000, 2003) in the brain. These abnormalities might have important consequences in the long term development of various forms of neural plasticity associated with opiate addiction in humans (Nestler 2001, 2002). In this context, mice disrupted in the ERK1 gene (resulting in enhanced ERK2 signalling) were more actively displaying facilitated striatal-mediated learning and memory, and showed a striking increase in sensitivity to the rewarding properties of morphine (Mazzucchelli *et al.* 2002).

Acknowledgements

This study was supported by grants 32-57066.99 from Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (FNSRS, Bern, Switzerland) and BFI2000-0306 and SAF2004-03685 from Fondo Nacional para el Desarrollo de la Investigación Científica y Técnica (MCyT, Madrid, Spain) to JAG-S. MF-A was supported by a predoctoral fellowship from FNSRS. MJG-F was supported by a predoctoral fellowship from CSIC/MECD-Associated Units. J.A. Garcia-Sevilla is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Spain).

References

- Adams J. P. and Sweatt J. D. (2002) Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 135–163.

- Akbadian S., Rios M., Liu R.-J. *et al.* (2002) Brain-derived neurotrophic factor is essential for opiate-induced plasticity of noradrenergic neurons. *J. Neurosci.* **22**, 4153–4162.
- Alessi D. R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D. T. and Saltiel A. R. (1995) PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**, 27489–27494.
- Berhow M. T., Hiroi N. and Nestler E. J. (1996) Regulation of ERK (extracellular signal-regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J. Neurosci.* **16**, 4707–4715.
- Bilecki W., Höllt V. and Przewlocki R. (2000) Acute δ -opioid receptor activation induces CREB phosphorylation in NG108-15 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **390**, 1–6.
- Blendy J. A. and Maldonado R. (1998) Genetic analysis of drug-addiction: the role of cAMP response element binding protein. *J. Mol. Med.* **76**, 104–110.
- Blom J. M. C., Tascadda F., Carra S., Ferraguti C., Barden N. and Brunello N. (2002) Altered regulation of CREB by chronic antidepressant administration in the brain of transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *Neuropsychopharmacology* **26**, 605–614.
- Chartoff E. H., Papadopoulou M., Konradi C. and Carlezon W. A. Jr (2003) Dopamine-dependent increases in phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) during precipitated morphine withdrawal in primary cultures of rat striatum. *J. Neurochem.* **87**, 107–118.
- Cobb M. H. (1999) MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 479–500.
- Derkinderen P., Enslin H. and Girault J.-A. (1999) The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* **10**, R24–R34.
- Duman R. S., Tallman J. F. and Nestler E. J. (1988) Acute and chronic opiate-regulation of adenylate cyclase in brain: specific effects in locus coeruleus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **246**, 1033–1039.
- Eitan S., Bryant C. D., Saliminejad N., Yang Y. C., Vojdani E., Keith D., Jr, Polakiewicz R. and Evans C. J. (2003) Brain region-specific mechanisms for acute morphine induced mitogen-activated protein kinase modulation and distinct patterns of activation during analgesic tolerance and locomotor sensitization. *J. Neurosci.* **23**, 8360–8369.
- Escribá P. V., Sastre M. and García-Sevilla J. A. (1994) Increased density of guanine nucleotide-binding proteins in the postmortem brains of heroin addicts. *Arch. Gen. Psychiatry* **51**, 494–501.
- Ferrer-Alcón F., García-Sevilla J. A., Jaquet P. E., La Harpe R., Riederer B. M., Walzer C. and Guimón J. (2000) Regulation of nonphosphorylated and phosphorylated forms of neurofilament proteins in the pre-frontal cortex of human opioid addicts. *J. Neurosci. Res.* **61**, 338–349.
- Ferrer-Alcón F., La Harpe R., Guimón J. and García-Sevilla J. A. (2003) Downregulation of neuronal cdk5/p35 in opioid addicts and opiate-treated rats: Relation to neurofilament phosphorylation. *Neuropsychopharmacology* **28**, 947–955.
- Ferrer-Alcón F., La Harpe R. and García-Sevilla J. A. (2004) Decreased immunodensities of μ -opioid receptors, receptor kinases GRK 2/6 and β -arrestin-2 in post-mortem brains of opiate addicts. *Mol. Brain Res.* **121**, 114–122.
- García-Sevilla J. A., Ferrer-Alcón F., Martín M., Kieffer B. L. and Maldonado R. (2004) Neurofilament proteins and cAMP pathway in brains of μ -, δ - or κ -opioid receptor gene knockout mice: effects of chronic morphine administration. *Neuropharmacology* **46**, 519–530.
- Grant P., Sharma P. and Pant H. C. (2001) Cyclin-dependent protein kinase 5 (CDK5) and the regulation of neurofilament metabolism. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1534–1546.
- Grewal S. S., York R. D. and Stork P. J. S. (1999) Extracellular signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 544–553.
- Guitart X., Thompson M. A., Mirante C. K., Greenberg M. E. and Nestler E. J. (1992) Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *J. Neurochem.* **58**, 1168–1171.
- Gutstein H. B., Rubie E. A., Mansour A., Akil H. and Woodgett J. R. (1997) Opioid effects on mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Anesthesiology* **87**, 1118–1126.
- Harada T., Morooka T., Ogawa S. and Nishida E. (2001) ERK induces p35, a neuron-specific activator of cdk5, through induction of Egr1. *Nat. Cell Biol.* **3**, 453–459.
- Lane-Ladd S. B., Pineda J., Boundy V. A., Pfeuffer T., Krupinski J., Aghajanian G. K. and Nestler E. J. (1997) CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J. Neurosci.* **17**, 7890–7901.
- Law P.-Y., Wong Y. H. and Loh H. H. (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol.* **40**, 389–430.
- Lesscher H. M. B., Burbach J. P. H., Van Ree J. M. and Gerrits M. A. F. M. (2003) ERK1/2 activation in rat ventral tegmental area by the μ -opioid agonist fentanyl: an *in vitro* study. *Neuroscience* **116**, 139–144.
- Liu J.-G. and Anand K. J. S. (2001) Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res. Rev.* **38**, 1–19.
- Maldonado R., Blendy J. A., Tzavara E., Gass P., Roques B. P., Hanoune J. and Schütz G. (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* **273**, 657–659.
- Mamiya T., Noda Y., Ren X., Hamdy M., Furukawa S., Kameyama T., Yamada K. and Nabeshima T. (2001) Involvement of cyclic AMP systems in morphine physical dependence in mice: prevention of development of morphine dependence by rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* **132**, 1111–1117.
- Mazzucchelli C., Vantaggiato C., Ciamei A. *et al.* (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**, 807–820.
- Meana J. J., González-Maeso J., García-Sevilla J. A. and Guimón J. (2000) μ -Opioid receptor and α_2 -adrenoceptor agonist stimulation of [³⁵S]GTP γ S binding to G-proteins in postmortem brains of opioid addicts. *Mol. Psychiatry* **5**, 308–315.
- Nestler E. J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Rev. Neurosci.* **2**, 119–128.
- Nestler E. J. (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol. Learn. Memorandum* **78**, 637–647.
- Nestler E. J. and Aghajanian G. K. (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* **278**, 58–63.
- Odagaki Y., García-Sevilla J. A., Huguelet P., La Harpe R., Koyama T. and Guimón J. (2001) Cyclic AMP-mediated signaling components are upregulated in the pre-frontal cortex of depressed suicide victims. *Brain Res.* **898**, 224–231.
- Ortiz J., Harris H. W., Guitart X., Terwilliger R. Z., Haycock J. W. and Nestler E. J. (1995) Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J. Neurosci.* **15**, 1285–1297.
- Pant A. C., Veeranna G. J., Pant H. C. and Amin N. (1997) Phosphorylation of human high molecular weight neurofilament protein (hNF-H) by neuronal cyclin-dependent kinase 5 (cdk5). *Brain Res.* **765**, 259–266.

- Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.-E., Karandikar M., Berman K. and Coob M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**, 153–183.
- Pouysségur J. and Lenormand P. (2003) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3291–3299.
- Sanna P. P., Simpson C., Lutjens R. and Koob G. (2002) ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal. *Brain Res.* **948**, 186–191.
- Schulz S. and Höllt V. (1998) Opioid withdrawal activates MAP kinase in locus coeruleus neurons in morphine-dependent rats *in vivo*. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 1196–1201.
- Shaw-Lutchman T. Z., Barrot M., Wallace T., Gilden L., Zachariou V., Impey S., Duman R. S., Storm D. and Nestler E. J. (2002) Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. *J. Neurosci.* **22**, 3663–3672.
- Shichinohe S., Ozawa H., Hashimoto E., Tatschner T., Riederer P. and Saito T. (2001) Changes in the cAMP-related signal transduction mechanism in postmortem human brains of heroin addicts. *J. Neural Transm.* **108**, 335–347.
- Simonato M. (1996) The neurochemistry of morphine addiction in the neocortex. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 410–415.
- Sweatt J. D. (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* **76**, 1–10.
- Tagliaro F., De Battisti Z., Smith F. P. and Marigo M. (1998) Death from heroin overdose: findings from hair analysis. *Lancet* **351**, 1923–1925.
- Van Biesen T., Luttrell L. M., Hawes B. E. and Lefkowitz R. J. (1996) Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **17**, 698–714.
- Veeranna G. J., Amin N. D., Ahn N. G., Jaffe H., Winters C. A., Grant P. and Pant H. C. (1998) Mitogen-activated protein kinase (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. *J. Neurosci.* **18**, 4008–4021.
- Veeranna G. J., Shetty K. T., Takahashi M., Grant P. and Pant H. C. (2000) Cdk5 and MAPK are associated with complexes of cytoskeletal proteins in rat brain. *Mol. Brain Res.* **76**, 229–236.
- Ventayol P., Busquets X. and García-Sevilla J. A. (1997) Modulation of immunoreactive protein kinase C- α and β isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **355**, 491–500.
- Widnell K. L., Russell D. S. and Nestler E. J. (1994) Regulation of expression of cAMP response element-binding protein in the locus coeruleus *in vivo* and in a locus coeruleus-like cell line *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 10947–10951.
- Widnell K. L., Self D. W., Lane S. B., Russell D. S., Vaidya V. A., Miserendino M. J., Rubin C. S., Duman R. S. and Nestler E. J. (1996) Regulation of CREB expression: *In vivo* evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 306–315.
- Williams J. T., Christie M. J. and Manzoni O. (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.* **81**, 299–343.
- Yu V. C., Richards M. L. and Sadée W. (1986) A human neuroblastoma cell line expresses μ and δ opioid receptor sites. *J. Biol. Chem.* **261**, 1065–1070.
- Zhang W.-B., Zhang Z., Ni Y.-X., Wu Y.-L. and Pei G. (2003) A novel function of G α_z : mediation of extracellular signal-regulated kinase activation by opioid receptor in neural cells. *J. Neurochem.* **86**, 1213–1222.

ANEXO EXPERIMENTAL II

Modulación del factor de transcripción Elk-1

en cerebros de adictos a opiáceos

(Complemento del Artículo V)

ANEXO EXPERIMENTAL II

Modulación del factor de transcripción Elk-1 en cerebros de adictos a opiáceos. (Complemento del artículo V).

El artículo anterior se acompaña de datos adicionales recientes que demuestran que en cerebros de adictos a opiáceos (abuso crónico) la densidad del factor de transcripción Elk-1, activado por ERK1/2, está reducida (27%, véase figura 1). Este resultado puso de manifiesto que la observada inhibición de ERK1/2 se traduce en una menor activación de factores nucleares diana de claro interés en la inducción de la plasticidad neuronal.

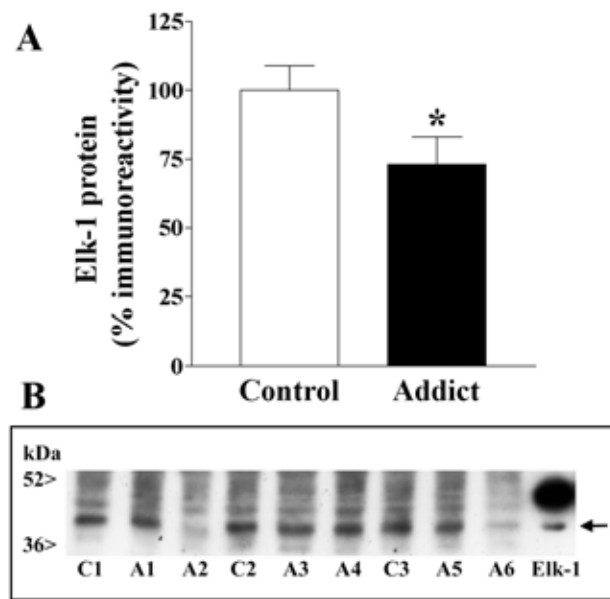


Figura 1. Inmunodensidad del factor de transcripción Elk-1 en la corteza prefrontal (área de Brodmann 9) de sujetos adictos a opiáceos. Las columnas son los valores de la media \pm ESM del homogenado total de los sujetos control (n=9) y de los adictos crónicos (n= 11) (emparejados por retraso autopsico, edad y sexo), expresados como % de cambio de inmunoreactividad. El recuadro muestra un “inmunoblot” representativo (40 μ g proteína) para la proteína Elk-1 (flecha, control positivo) en la corteza prefrontal de varios sujetos (tres series de un control emparejado con 2 adictos).

ANEXO EXPERIMENTAL III

**Modulación del complejo Fas/FADD y caspasas
efectoras en cerebros de adictos a opiáceos**

(Complemento del Artículo V)

ANEXO EXPERIMENTAL III

Modulación del complejo Fas/FADD y caspasas efectoras en cerebros de adictos a opiáceos. (Complemento del artículo V).

Siguiendo con el modelo humano de adicción a opiáceos, los datos de este Anexo experimental muestran la modulación del receptor Fas (formas glicosilada y agregadas), de la proteína FADD y de las caspasas-8 y 3 en la corteza prefrontal de dos grupos de adictos a opiáceos diferentes en cuanto a la duración de la adicción (“short-term abuse” y “long-term abuse”). El único componente de la vía (Fas/FADD) alterado en estos sujetos fue la proteína transductora FADD que se encontró disminuida en los dos grupos de adictos estudiados (31% y 28%, respectivamente, véanse figuras 1, 2 y 3). Estos resultados sugieren que en cerebro de adictos crónicos a opiáceos, a diferencia de lo observado en cerebro de rata, no se desarrolla un proceso de tolerancia a la reducción inicial de FADD (inhibición sostenida de la vía de señalización de Fas), lo que parecía contribuir en mayor medida a un posible amortiguamiento de una temprana activación de Fas.

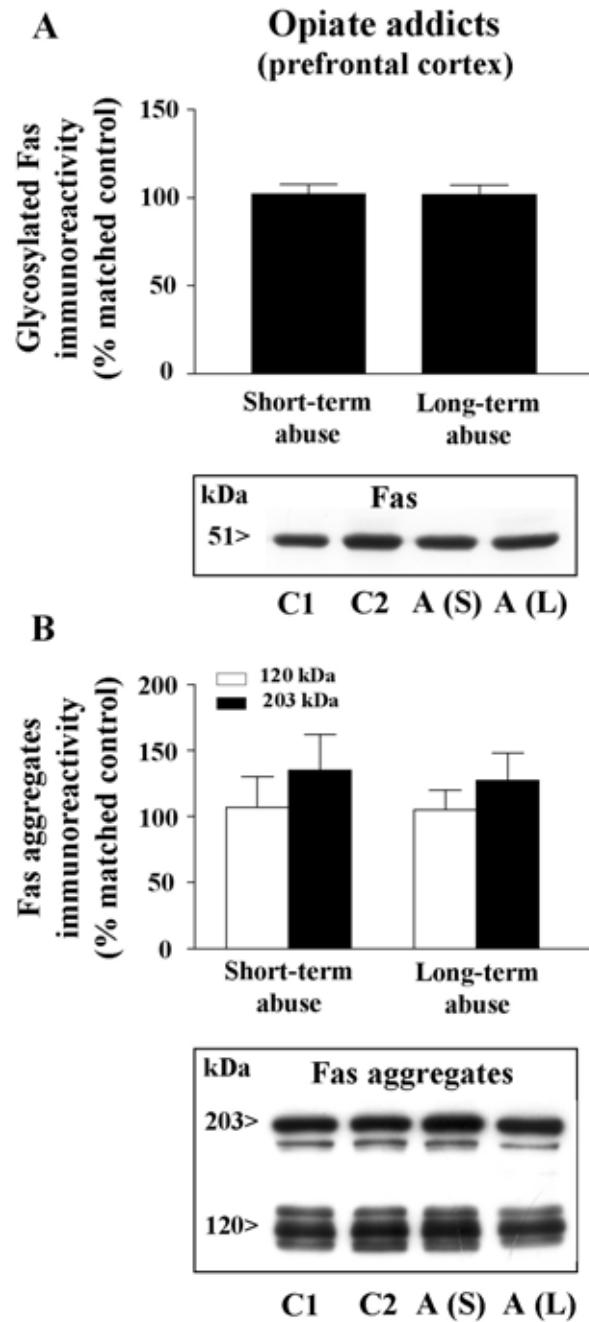


Figura 1. Inmunodensidades del receptor Fas (A: banda glicosilada de 51-kDa; B: agregados de 120- y 203-kDa) en la corteza prefrontal (área de Brodmann 9) de dos grupos de sujetos adictos a opiáceos diferentes en cuanto a la duración de la adicción: A(S), “Short-term abuse” y A(L), “Long-term abuse”. Las columnas son los valores de la media \pm ESM de los sujetos adictos A(S) y A(L), frente al 100% del control (emparejados por retraso autopsico, edad y sexo). En los recuadros se muestran los “immunoblots” representativos (40 μ g proteína) para las proteínas de estudio en la corteza prefrontal de dos sujetos control y dos adictos a opiáceos.

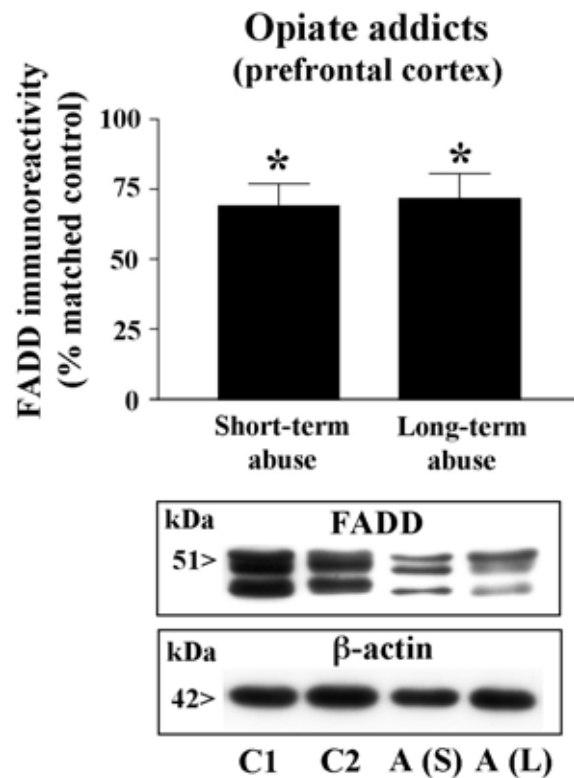


Figura 2. Inmunodensidad de la proteína FADD en la corteza prefrontal (área de Brodmann 9) de dos grupos de sujetos adictos a opiáceos diferentes en cuanto a la duración de la adicción: A(S), “Short-term abuse” y A(L), “Long-term abuse”. Las columnas son los valores de la media \pm ESM de los sujetos adictos A(S) y A(L), frente al 100% del control (emparejados por retraso autopsico, edad y sexo). En los recuadros se muestran los “immunoblots” representativos (40 μ g proteína) para el FADD y la β -actina (misma membrana en la que se inmunodetectó el FADD) en la corteza prefrontal de dos sujetos control y dos adictos a opiáceos. El “immunoblot” de la β -actina nos sirvió como un control interno del experimento (control de carga). *P<0.05 (test-t de Student).

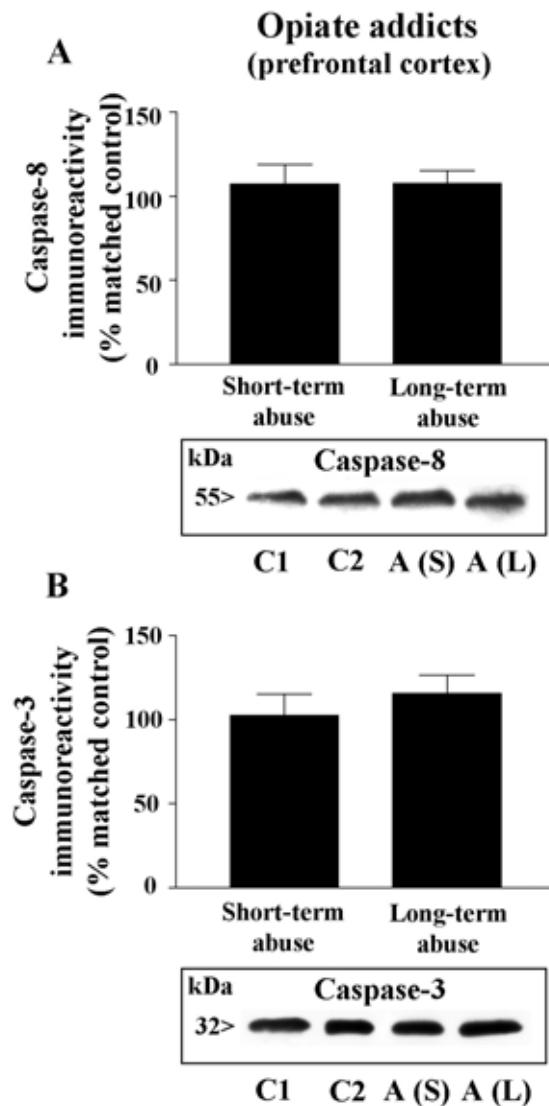


Figura 3. Inmunodensidades de la caspasa-8 (A) y de la caspasa-3 (B) en la corteza prefrontal (área de Brodmann 9) de dos grupos de sujetos adictos a opiáceos diferentes en cuanto a la duración de la adicción: A(S), “Short-term abuse” y A(L), “Long-term abuse”. Las columnas son los valores de la media \pm ESM de los sujetos adictos A(S) y A(L), frente al 100% del control (emparejados por retraso autopsico, edad y sexo). En los recuadros se muestran los “inmunoblots” representativos (40 μ g proteína) para la caspasa-8 y la caspasa-3 en la corteza prefrontal de dos sujetos control y dos sujetos adictos a opiáceos.

V. DISCUSIÓN

ANTECEDENTES

Poco antes de iniciar este trabajo de Tesis doctoral se había sugerido que tras una exposición prolongada con fármacos opiáceos se podría inducir daño neuronal, especialmente sobre el citoesqueleto de las neuronas (García-Sevilla *et al.*, 1997). Se ha señalado que las interacciones célula-matriz deben jugar un papel importante en la apoptosis, específicamente en la regulación de la apoptosis dependiente de proteínas de anclaje. De hecho, los elementos del citoesqueleto (como son los filamentos intermedios y los microfilamentos) son substratos tanto del ligando Fas como de las caspasas. Un desajuste en el citoesqueleto podría inducir citotoxicidad y muerte celular apoptótica (Kothakota *et al.*, 1997; Abbracchio *et al.*, 1999). En este contexto, el tratamiento crónico con morfina en ratas redujo marcadamente las inmunodensidades de las proteínas de los neurofilamentos (NF-L, el principal filamento intermedio del citoesqueleto neuronal), en varias regiones cerebrales relevantes para la adicción a opiáceos (Beitner-Johnson *et al.*, 1992; Boronat *et al.*, 1998; Jaquet *et al.*, 2001; resultados de esta Tesis). De manera similar, las inmunodensidades de las formas no fosforiladas del NF también se encontraron disminuidas en cerebros *postmortem* de adictos crónicos a heroína (García-Sevilla *et al.*, 1997; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000). Además, también se demostró la existencia de una hiperfosforilación anormal tanto de NF-H como de NF-M en cerebros de adictos a opiáceos (Ferrer-Alcón *et al.*, 2000), así como en cerebros de ratas dependientes de morfina (Jaquet *et al.*, 2001). En pacientes con dependencia a opiáceos, mediante la técnica de tomografía craneal computerizada, se demostró la presencia de un alargamiento del espacio pericortical y de los dos ventrículos laterales indicando una pérdida de volumen de corteza frontal (Pezawas *et al.*, 1998). La morfina crónica en ratas también redujo el tamaño y el calibre de las dendritas y del soma de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas (Sklair-Tavron *et al.*, 1996), y el número de espinas dendríticas de neuronas en varias regiones cerebrales (Robinson y Kolb, 1999; Liao *et al.*, 2005). La alteración del citoesqueleto en neuronas diana podría inducir citotoxicidad y muerte celular apoptótica. En la corteza cerebral de ratones, la morfina crónica disminuyó el número de neuronas positivas en calbindina D-28 kDa (una proteína que se une a calcio y tiene actividad neuroprotectora) (Maharajan *et al.*, 1998), lo que también podría estar relacionado con el daño neuronal inducido por los fármacos opiáceos. Más recientemente, se observó en el hipocampo de rata adulta, una disminución en la neurogénesis debida a la administración crónica de morfina o la auto-administración de heroína, sin verse alterado el número

normal de células apoptóticas (Eisch *et al.*, 2000). La combinación de todas estas evidencias sugirió que ciertos cambios estructurales, morfológicos y funcionales inducidos por la exposición crónica a opiáceos en ratas y en humanos podrían traducirse en alguna forma de daño neuronal (Nestler, 1996; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000), y que este daño neuronal podría estar relacionado, en parte, con la capacidad que muestran los fármacos opiáceos para alterar marcadamente las proteínas del citoesqueleto NF (Ferrer-Alcón *et al.*, 2000).

MODULACIÓN DEL RECEPTOR FAS EN LA ADICCIÓN A OPIÁCEOS

A raíz de estas observaciones, se decidió realizar un estudio piloto para averiguar si los opiáceos podrían inducir algún tipo de toxicidad neuronal alterando la densidad de dos proteínas clave de la vía apoptótica, el receptor pro-apoptótico Fas (vía extrínseca), y la oncoproteína anti-apoptótica Bcl-2 (vía intrínseca). El descubrimiento inicial de este estudio asoció el tratamiento crónico de ratas con morfina (estados de tolerancia y dependencia) con la modulación opuesta de estas dos proteínas clave involucradas en la regulación de la muerte celular programada: un marcado incremento en la densidad del receptor Fas (forma glicosilada de 48 kDa) y una moderada disminución en la abundancia de la oncoproteína Bcl-2. Este tratamiento con morfina también disminuyó la inmunodensidad del neurofilamento, NF-L. Todos los efectos que ejerció la morfina crónica en cerebro de rata fueron bloqueados con la administración simultánea de naloxona, un antagonista de los receptores opioides. Estas observaciones *in vivo* indican que los efectos estimuladores y inhibitorios que ejerce la morfina crónica sobre el receptor pro-apoptótico Fas (forma glicosilada de 48 kDa) y sobre la oncoproteína anti-apoptótica Bcl-2 respectivamente en cerebro, y sobre las proteínas del NF-L, están mediados a través de la activación sostenida de los receptores opioides, en especial los del tipo μ .

Estudios previos *in vitro* demostraron la habilidad de la morfina y del DAMGO (un agonista específico del receptor μ -opioide) para inducir apoptosis en linfocitos T y/o en células Jurkat, a través de mecanismos asociados con una disminución de expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y un incremento en la proteína pro-apoptótica Bax (Singhal *et al.*, 1999). Además, la morfina, a través de la activación de receptores opioides, incrementó la expresión del mRNA del receptor pro-apoptótico Fas en linfocitos así como en bazo, pulmón y corazón de ratón (Yin *et al.*, 1999). Por otro lado, en linfocitos esplénicos de ratones sometidos a estrés, que presentan incrementos en sus niveles

endógenos de opioides, la expresión del mRNA de Fas se encontró incrementada. Al ser este efecto antagonizado por la naloxona, se sugirió que la apoptosis de linfocitos mediada por Fas dependía de los niveles endógenos de opioides. Así, en ratones sometidos a estrés, se sugirió la existencia de una regulación tónica del receptor Fas mediada por opioides endógenos (Yin *et al.*, 2000). En el presente trabajo de Tesis, sin embargo, el tratamiento agudo de ratas con dosis moderadas y elevadas de morfina o de naloxona no alteró la inmunodensidad del receptor Fas (forma glicosilada de 48 kDa) o de la oncoproteína Bcl-2 en cerebro. Además, al bloquear los receptores opioides con naloxona, durante 13 días, no se provocaron cambios significativos en la expresión de las proteínas diana (Fas de 48 kDa, o Bcl-2). Estos resultados negativos no parecían sugerir la existencia de una regulación tónica mediada por péptidos opioides endógenos (como las endorfinas), vía receptores opioides, sobre el contenido proteico de Fas (48 kDa) y Bcl-2 en cerebro de rata.

El marcado aumento de expresión del receptor Fas pro-apoptótico (48 kDa) y la disminución moderada de la oncoproteína anti-apoptótica Bcl-2, junto con otros descubrimientos previos (Singhal *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 1999), parecían indicar que la morfina y otros fármacos opiáceos, a través de la activación de receptores opioides, podían promover tanto *in vitro* como *in vivo* una muerte celular programada anormal. De hecho, tras una exposición prolongada con fármacos opiáceos, la inducción aberrante de apoptosis podría ser, en tipos específicos de neuronas, una consecuencia esperable del daño neuronal inducido sobre los neurofilamentos (Nestler, 1996; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000).

Con el fin de estudiar con más detalle el receptor Fas en cerebro de mamíferos y su posible rol en la adicción a opiáceos, se caracterizaron detalladamente varias formas de esta proteína: la forma nativa, que presentó una masa molecular relativa de ~35 kDa, las formas glicosiladas, que oscilaron entre ~45-52 kDa, y las formas agregadas de elevada masa molecular (120 y 203 kDa). La inmunodetección de estas formas de Fas en cerebro de rata, ratón y humano, así como en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, estuvo en concordancia con estudios previos realizados en varias líneas celulares humanas donde se usaron anticuerpos similares dirigidos contra el dominio citoplasmático de Fas (Kamitani *et al.*, 1997). En timocitos de ratones deficientes en Fas, por delección del exón 9 en el gen que codifica la región citoplasmática del receptor Fas, no se expresaron ni los mRNA ni las proteínas relacionadas con Fas (~40-45 kDa) (Adachi *et al.*, 1995). Los agregados de Fas parecen estar formados por un complejo de monómeros intactos de Fas

(Kamitani *et al.*, 1997), y esta homo-oligomerización del receptor parece ser la forma de señalización inicial de Fas (Kischkel *et al.*, 1995; Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002). Estos agregados de Fas resistentes a la acción desnaturizante del sodio dodecil sulfato (SDS) y del β -mercaptoetanol habían sido ya descritos en varias líneas celulares (Kischkel *et al.*, 1995; Kamitani *et al.*, 1997; Papoff *et al.*, 1999; Siegel *et al.*, 2000a; Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002). Así, la unión de Fas con un agente químico o con un anticuerpo agonista indujo la formación de agregados de Fas (i.e., complejos de monómeros de Fas intactos de 120, 180 y/o ~206 kDa) que pudieron inmunodetectarse con anticuerpos dirigidos contra el dominio citoplasmático de la proteína (como el anticuerpo anti-Fas M-20 usado en este trabajo) (Kamitani *et al.*, 1997; Papoff *et al.*, 1999). Estos agregados de Fas podrían corresponder a formas diméricas o triméricas del receptor, o incluso a formas agregadas de mayor orden (oligomerización de las formas de Fas; Papoff *et al.*, 1999; Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002). En otros estudios se inmunodetectaron dímeros y oligómeros para otros tipos de receptores, bajo las mismas condiciones de solubilización del receptor y de resolución por SDS-PAGE desnaturizante, lo que demostró que estas especies agregadas del receptor no eran resultado de enlaces disulfuro anómalos durante la preparación de la muestra (Ng *et al.*, 1996; Cvejic y Devi, 1997; Lee *et al.*, 2003; Salahpour *et al.*, 2003). Además, la disociación de las especies oligoméricas de los β_2 -adrenoceptores se acompañó de un incremento de expresión de las formas monoméricas (Salahpour *et al.*, 2003). Resultados de este trabajo de Tesis doctoral mostraron que el NEM o NMM (un reactivo alquilante de sulfhidrilos) redujo la inmunodensidad de los agregados de Fas de ~203 kDa en membranas de cerebro de rata a la vez que incrementó las densidades de la forma nativa (35 kDa) y de las formas glicosiladas del receptor (51/48 kDa), lo que indicó una relación clara entre las formas agregadas de Fas (requieren puentes disulfuro para mantener la estabilidad de los oligómeros) y sus formas monoméricas en tejido cerebral. Por tanto, estos resultados muestran que los agregados de Fas de elevada masa molecular también se expresan de forma nativa en cerebro de mamífero y que estas formas (oligomerización del receptor) pueden ser detectadas por análisis de “Western blot” bajo condiciones desnaturizantes.

El proceso de glicosilación de las proteínas es una de las modificaciones post-translacionales más comunes ocurrida en los receptores de membrana. La unión de los grupos glicano es relevante para la interacción ligando-receptor así como para la señalización celular. El receptor Fas contiene dos lugares putativos de N-glicosilación en

su dominio extracelular, los residuos N22 y N93 (Itoh *et al.*, 1991; Oehm *et al.*, 1992; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992; Kamitani *et al.*, 1997; Krammer, 2000). En este trabajo de Tesis, la expresión diferencial de las proteínas glicosiladas en cerebro dependió aparentemente de la preparación de la muestra: la extracción de proteínas con el detergente Tritón X-100 mejoró la inmunodetección de la forma glicosilada de Fas de 48 kDa. Es interesante señalar que la N-deglicosilación del receptor Fas incrementó la inmunodensidad de las formas agregadas de Fas (~110/120: entre 5 y 6 veces, y 203 kDa: entre 2 y 3 veces) en corteza cerebral de rata. Se ha demostrado que la heterodimerización de los adrenoceptores α_{2A}/β_1 se incrementa al provocar mutaciones puntuales que bloqueaban la N-glicosilación en los receptores (N10A, N15A), lo que indicó que la interacción física entre estos dos adrenoceptores está regulada por el estado de glicosilación de los mismos: la ausencia de glicosilación altera las conformaciones de ambos adrenoceptores de tal manera que se incrementa la eficiencia de la heterodimerización (Xu *et al.*, 2003). Además, este incremento en la heterodimerización de los adrenoceptores mutados tuvo cierta relevancia funcional, ya que moduló la internalización del receptor y alteró las propiedades farmacológicas de uno de los receptores (Xu *et al.*, 2003). En estudios previos del mismo grupo (He *et al.*, 2002), el bloqueo de la N-glicosilación (N15A) del adrenoceptor β_1 redujo la homodimerización del receptor. Se sabe, sin embargo, que los efectos que la N-glicosilación puede inducir en los receptores es muy variable (véase He *et al.*, 2002). Los resultados presentados en este trabajo de Tesis doctoral indican que la expresión nativa de los homodímeros del receptor Fas en cerebro se incrementó tras deglicosilar el receptor, por lo que se sugiere que la glicosilación de Fas debe jugar un papel relevante regulando la dimerización del receptor. Como la formación de agregados de Fas parece ser uno de los eventos iniciales necesarios para la señalización a través de este receptor (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002), también se consideró de relevancia estudiar la modulación por fármacos opiáceos de estas formas agregadas de Fas.

El tratamiento crónico con heroína (estado de tolerancia) moduló diferencialmente el receptor Fas, incrementando la inmunoreactividad de la forma nativa de Fas de 35 kDa y disminuyendo la de la forma glicosilada de 51 kDa. La abstinencia espontánea a heroína (estado de dependencia) también se asoció con incrementos de Fas en cerebro de rata, como el aumento sustancial observado para la forma nativa de Fas (35 kDa), y con la inducción de incrementos de densidad para las formas glicosiladas (48 y 51 kDa). La

morfina crónica indujo también un aumento en la regulación de la forma nativa de Fas (35 kDa). Los tratamientos agudos con los agonistas μ -opioides heroína y morfina, pero no los realizados con agonistas selectivos δ - o κ -opioides, incrementaron el contenido de la forma nativa de Fas (35 kDa). Estos resultados demuestran la importancia de los receptores μ -opioides en la rápida modulación del Fas nativo (35 kDa) en cerebro, y amplían descubrimientos previos en los que se observó una modulación de la forma glicosilada del receptor Fas (48 kDa) en ratas dependientes de morfina (vía mecanismo sensible a naloxona) (resultados de este trabajo de Tesis).

La administración crónica de morfina (estados de tolerancia y dependencia al opiáceo), pero no la administración aguda, se asoció con incrementos en la inmunodensidad de los agregados de Fas (~110/120 y 203 kDa) en corteza cerebral de rata. Los tratamientos agudo y/o crónico con el agonista opioide δ -selectivo (SNC-80) y con el κ -selectivo (U-50488-H) no alteraron significativamente el contenido de los agregados de Fas en cerebro de rata, aunque el SNC-80 indujo una disminución modesta, pero significativa, sobre las formas agregadas de 120 kDa. En conjunto, estos resultados claramente indican que la tolerancia y la dependencia a opiáceos en ratas, mediada a través de la estimulación sostenida de los receptores μ -opioides, no sólo se asoció con incrementos en las inmunodensidades de Fas nativo y glicosilado, sino que también se asoció con incrementos en las formas agregadas del receptor (trímero), que al parecer son las formas requeridas para iniciar la señalización del receptor (Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002).

Estos resultados van en línea con el incremento observado en la expresión del mRNA del receptor Fas y de su proteína en varios tejidos y células mediado por la activación de receptores opioides (principalmente de tipo μ -opioide) (Yin *et al.*, 1999, 2000; Chatzaki *et al.*, 2001; Singhal *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002) previamente comentado. En este contexto, es interesante destacar que la inmunodensidad basal de la forma nativa de Fas (35 kDa) se encontró disminuida en ratones deficientes del receptor μ -opioide (30%, n=5, p<0.05) (resultados de este estudio, Anexo experimental I), lo que sugirió que los receptores μ -opioides podrían estimular tónicamente, vía péptidos opioides endógenos, la activación de la forma nativa de Fas (35 kDa) en cerebro, como se sugirió previamente para ratones sometidos a estrés (véase inicio de la Discusión; Yin *et al.*, 2000). El contenido de las proteínas glicosiladas de Fas (péptidos de 48 y 51 kDa) no se encontró modificado en estos ratones μ -deficientes (Anexo experimental I; véase también Wang *et al.*, 2002). Estos resultados corroboran la ausencia de una regulación tónica sobre la forma

glicosilada de Fas (48 kDa), tal como previamente se sugirió tras la administración de naloxona crónica (13 días). Además, la expresión basal de la forma nativa de Fas (35 kDa) y la de las formas glicosiladas (48 y 51 kDa) no se encontró modificada en ratones deficientes en los receptores δ - y κ -opioides (Anexo experimental I). Estos datos van en la misma línea que los efectos estimuladores observados para el tratamiento agudo de heroína y morfina sobre la forma nativa de Fas (35 kDa) en cerebro de rata y ponen de manifiesto la relevancia de los receptores μ -opioides a la hora de mediar los efectos de estos agonistas opiáceos. Sin embargo, al estudiar la inmunodensidad basal de las formas agregadas de Fas en los ratones deficientes en los receptores opioides, la densidad de los agregados de 120 kDa (trímeros) se encontró incrementada (93%) en ratones deficientes en los receptores δ -opioides, pero no en los μ - ni κ -deficientes. Esta modulación concuerda con la modesta disminución, aunque significativa, observada sobre estas formas agregadas de Fas (120 kDa) en cerebro de rata tras la administración aguda del agonista δ -selectivo SNC-80, y ponen de manifiesto la posible relevancia de los receptores δ -opioides en mediar una inhibición tónica de esta forma de señalización inicial del receptor Fas.

Al inicio de esta discusión, se asoció la administración crónica de morfina con un incremento del contenido de la forma glicosilada de Fas (48 kDa) en cerebro de rata. Posteriormente, tras profundizar con más detalle en el estudio, y caracterizar las proteínas relacionadas con el receptor Fas se observó de nuevo que la morfina crónica incrementó la forma glicosilada de Fas de 48 kDa, pero disminuyó la expresión de la otra forma glicosilada del receptor (51 kDa). Sin embargo, ni la heroína crónica ni la abstinencia a heroína alteraron la forma glicosilada de Fas de 48 kDa en cerebro de rata. No se conoce la razón de este resultado, pero se sabe que la morfina y la heroína (diacetil-morfina) difieren en algunos efectos (Schuller *et al.*, 1999), aunque también es cierto que en estudios recientes se ha puesto de manifiesto que las eficacias *in vivo* de heroína, 6-acetilmorfina y morfina están mediadas por poblaciones farmacológicamente similares de receptores μ -opioides (Negus *et al.*, 2003).

Una mención a parte merecen los efectos inducidos por fármacos opiáceos atípicos, como la pentazocina, y otros antaño caracterizados como opioides y hoy clasificados como ligandos de receptores σ_1 . En contraste a los efectos provocados tras la administración de heroína y morfina de forma aguda y crónica sobre la forma nativa de Fas (35 kDa, incrementada) en cerebro de rata, la administración de (\pm)-pentazocina crónica indujo una disminución en la densidad de Fas (35 y 48/51 kDa). La pentazocina es un fármaco

analgésico con propiedades “agonista-antagonista” opiáceas, y también un potente agonista del receptor σ_1 (Mei y Pasternak, 2001). Los dos enantiómeros de la pentazocina presentan buenas afinidades por el receptor σ_1 (K_i : 2.5-18 nM; Mei y Pasternak, 2001), aunque la (-)-pentazocina también muestra una buena afinidad por los receptores μ - (K_i : 5.7 nM, antagonista), κ - (K_i : 7.2 nM, agonista) y δ - (K_i : 31 nM, agonista) opioides (Raynor *et al.*, 1994; Craft y McNiel, 2003). En otros aspectos, los receptores definidos como σ ya no son considerados como receptores opioides, ya que la naloxona no puede acceder a ellos (Quirion *et al.*, 1992). Los efectos inhibitorios de la pentazocina crónica sobre Fas (forma nativa, 35 kDa, y glicosiladas, 48 y 51 kDa) no se pueden asociar con su propiedad μ -antagonista, ya que el tratamiento crónico con dosis elevadas de naloxona (10 mg/kg durante 13 días) no alteró la expresión de Fas (48 kDa) en cerebro de rata (resultados de este estudio). De manera similar, los tratamientos agudos con agonistas opioides selectivos δ - (SNC-80) y κ - (U 50488-H) no disminuyeron el contenido de Fas (formas nativa, 35 kDa, y glicosiladas, 48 y 51 kDa) en cerebro. Por contra, los tratamientos agudo y crónico con el agonista σ_1 -selectivo (SKF 10047 se comporta también como un agonista mixto de los receptores δ/κ -opioides) disminuyeron, vía un mecanismo específico del receptor σ_1 , el contenido de la forma nativa de Fas (35 kDa) así como el de las formas monoméricas de Fas (formas agregadas) en cerebro de rata.

Es interesante observar que en el tratamiento crónico con pentazocina se encontró reducida la densidad de las formas glicosiladas de Fas (48 y 51 kDa), hecho que no ocurrió con el agonista σ_1 , lo que sugiere que la pentazocina es capaz de modular algunos mecanismos de maduración del receptor Fas tras su síntesis. Los receptores σ_1 , a nivel funcional, forman un potente sistema anti-opioide, cuya activación reduce marcadamente la analgesia opioide en ratones (Mei y Pasternak, 2002). La reducción en la inmunodensidad de Fas nativo (35 kDa) inducida por pentazocina crónica va en línea con su efecto anti-opioide descrito, y es opuesto al aumento inducido por heroína y morfina. Estos resultados indican claramente la implicación de diferentes receptores para el efecto de heroína y morfina (μ) y pentazocina (σ_1) modulando el receptor Fas.

Como complemento también se indagó sobre el rol de la dinamina en la adicción a opiáceos. La dinamina es una fosfoproteína neuronal y una enzima GTP-asa que juega un papel esencial en la endocitosis de receptores (e.g., los receptores opioides) vía vesículas recubiertas de clatrina y caveolinas (McClure y Robinson, 1996). En el presente estudio, los tratamientos agudos y/o crónicos con fármacos opiáceos (heroína y morfina) así como

la abstinencia a opiáceos (heroína) indujeron un marcado incremento en el contenido de dinamina en cerebro de rata. Estos resultados revelan la importancia de esta diana molecular en la adicción a opiáceos, confirmando y extendiendo observaciones previas sobre la modulación de dinamina en la adicción a morfina (Noble *et al.*, 2000). En este sentido es interesante destacar que el tratamiento crónico con naltrexona, un antagonista de los receptores opioides, se asoció con una reducción en la inmunodensidad de dinamina (30%) en la médula espinal de ratones (Patel *et al.*, 2002), lo que refuerza la idea de la importancia de esta diana molecular en la adicción a opiáceos, así como su posible regulación tónica por el sistema opioide. Además, la pentazocina crónica también incrementó el contenido de dinamina en cerebro de rata, lo que también sugirió un posible papel de los receptores σ_1 en su regulación. El aumento en el contenido de dinamina provocado por fármacos opiáceos podría contribuir a la plasticidad del sistema opioide endógeno, relevante en el desarrollo de tolerancia y dependencia a los fármacos opiáceos (Noble *et al.*, 2000). En este contexto, este aumento de dinamina en regiones específicas del cerebro podría regular el nivel de expresión de los receptores opioides, modulando la internalización del receptor, inducida por fármacos opiáceos (Murray *et al.*, 1998; Whistler y Von Zastrow, 1999).

En resumen, los estudios iniciales realizados sobre el receptor Fas indican que la adicción a heroína/morfina en ratas (estados de tolerancia y/o dependencia) se asoció con un aumento en la inmunodensidad de la forma nativa de Fas (35 kDa), con diferentes expresiones de las formas glicosiladas del receptor (48 y 51 kDa), y con incrementos de las formas agregadas (120 y 203 kDa) en el cerebro. Además los agregados de Fas, que se expresan de forma nativa en membranas cerebrales de rata, ratón y humano, están regulados por el grado de glicosilación del receptor. La activación del receptor Fas por morfina (a través de un mecanismo indirecto) sugiere que este opiáceo, involucrando receptores μ -opioides, puede promover apoptosis en ciertas células periféricas (demostrado para linfocitos) y en ciertos tipos de neuronas en cerebro (no demostrado todavía *in vivo*). Estos hallazgos parecen abrir una nueva dimensión en la neurobiología de la adicción a opiáceos, tanto a nivel periférico como central (Yin *et al.*, 2000; resultados de este trabajo de Tesis), con referencia a una posible neurotoxicidad de estos fármacos y/o a una nueva vía de señalización modulada por los mismos. Como ya se ha comentado, la adicción a opiáceos, tanto en animales de experimentación como en humanos, se ha asociado con alteraciones del citoesqueleto de las neuronas (contenido y grado de fosforilación de los

neurofilamentos) que bien podrían reflejar un proceso de neurotoxicidad y/o de cambios plásticos relacionados con los procesos moleculares de la adicción (véase por ejemplo, Boronat *et al.*, 1998; Robinson y Kolb, 1999; Ferrer-Alcón *et al.*, 2000, 2003). Sin embargo, dado que la mayoría de neuronas (excepto las motoneuronas) son resistentes a los efectos apoptóticos inducidos por el receptor Fas (Raoul *et al.*, 2002; Wajant, 2002; Desbarats *et al.*, 2003), la activación de este receptor por la morfina podría representar un nuevo componente en las complejas cascadas de señalización celular que utilizan los receptores opioides (Williams *et al.*, 2001). Así pues, las posibles consecuencias funcionales del aumento de la forma nativa de Fas (35 kDa) y de sus formas agregadas (trímeros de 120 kDa) en la adicción a opiáceos no se han todavía aclarado. Por esta razón se decidió continuar profundizando en esta vía de señalización celular, investigando en detalle el estado de la proteína transductora FADD y de caspasas efectoras en la adicción a opiáceos (véase el esquema presentado en el apartado Objetivos).

MODULACIÓN DE LA PROTEÍNA FADD Y CASPASAS EFECTORAS 8 Y 3 EN LA ADICCIÓN A OPIÁCEOS

La proteína FADD se inmunodetectó en homogenado total de cerebro de rata, ratón y humano como formas no-fosforiladas (migración más rápida) y fosforiladas (migración más lenta) (véase Zhang y Winoto, 1996; Scaffidi *et al.*, 2000), lo que indicó que el anticuerpo utilizado de forma preferente (H-181) reaccionó con FADD independientemente del estado de fosforilación de la proteína. A lo largo de este estudio de Tesis doctoral se ha demostrado que las proteínas que constituyen el complejo de señalización inductor de muerte 'DISC' (Fas, FADD, y caspasa-8) están presentes en membranas cerebrales de manera constitutiva, como también ocurre en diversas líneas celulares. El complejo DISC parece poseer una estequiometría determinada entre las proteínas que lo conforman con una relación de 3:3:3, que estaría organizada por la estructura trimérica del receptor pre-asociado Fas (Siegel *et al.*, 2000a). De hecho, formas celulares mutantes con ausencia de Fas no son capaces de reclutar tres moléculas de FADD y por tanto no forman el complejo DISC (revisado en Tibbets *et al.*, 2003). En tejido cerebral, como ya se describió en otros sistemas celulares (véase Donepudi *et al.*, 2003), sólo se inmunodetectó la forma monomérica de la procaspasa-8. Sin embargo, la forma monomérica de la proteína FADD (de aproximadamente 25 kDa) no se detectó en corteza cerebral de ratas postnatales (P1-22) (Cheema *et al.*, 1999) o únicamente mostró una señal muy débil en corteza cerebral de ratas adultas (resultados de este estudio). Por tanto, la

proteína FADD (anticuerpo H-181) en cerebro se expresa principalmente como un homodímero/trímero, como también se demostró para los agregados del receptor Fas (35 kDa) de aproximadamente 110/120 kDa (trímeros) identificados en cerebro de rata.

Referente a la modulación de FADD en la adicción a opiáceos, cabe destacar, en primer lugar que los tratamientos agudos con los agonistas μ - (sufentanilo, morfina), δ - (SNC-80) y κ -opioides (U50488H) indujeron disminuciones del contenido de FADD en cerebro de rata tras la activación del correspondiente receptor opioide, ya que los efectos fueron antagonizados por fármacos específicos (naloxona, naltrindol y nor-binaltorpimina, respectivamente). En segundo lugar, se observó que la administración repetida de fármacos opiáceos (morfina, SNC-80, y U50488H) durante 5 días resultó en la inducción de tolerancia a los efectos agudos inhibitorios observados sobre FADD. En tercer lugar, se observó que en ratas tolerantes a opiáceos (previamente tratadas con morfina y SNC-80), la abstinencia provocada por la administración de antagonistas específicos también se asoció con una disminución en la densidad de la proteína FADD. El tratamiento crónico con U50488H (κ -agonista) no indujo cambios significativos sobre FADD tras inducir la abstinencia al opiáceo. Por último, se observó que la administración en ratas de un inhibidor selectivo de la MEK1/2 (SL 327) previno la disminución inducida sobre el FADD por el SNC-80 (δ -agonista), lo que demostró la participación de la activación ERK1/2 en la regulación *in vivo* de FADD por fármacos opiáceos (discutido más abajo en otro apartado).

En cuanto a los efectos agudos de los fármacos opiáceos sobre la inmunodensidad de FADD en el cerebro, el sufentanilo y la morfina indujeron curvas dosis-respuesta acampanadas (incrementos y decrementos), aunque los efectos inhibitorios fueron más importantes, como fue el caso para el SNC-80 y U50488H. En este contexto, cabe mencionar que los fármacos opiáceos y varios agentes apoptóticos pueden inducir efectos bifásicos en múltiples sistemas biológicos, con unas respuestas estimuladoras moderadas y con unos marcados efectos inhibitorios (Calabrese, 2001a, b). En esta línea, la comparación de dosis altas y bajas de morfina *in vitro* también reveló efectos duales dependientes de la concentración, i.e., mitogénesis a baja concentración y inhibición del crecimiento o apoptosis a concentraciones altas (véase Singhal et al., 1998; Gupta et al., 2002). Estos resultados demuestran que los receptores μ -, δ -, y κ -opioides juegan, conjuntamente, un papel en la regulación farmacológica aguda del FADD, aunque también se sugiere que el receptor δ -opioide podría tener un rol funcional preponderante como

modulador de esta proteína apoptótica clave en el cerebro. Como se muestra en el Anexo I, la inmunodensidad basal de la proteína FADD se encontró incrementada en la corteza cerebral ($48 \pm 12\%$, $n=5$, $p < 0.01$) de ratones deficientes en el receptor δ -opioide, y no se encontró alterada en ratones μ - y κ -KO, lo que sugiere la existencia de un tono opioide endógeno que actuando tónicamente sobre los receptores δ -opioides inhibiría la expresión de FADD en cerebro. Este tono basal sería similar al descrito más arriba para los agregados de Fas (trímero). En este sentido cabe resaltar, una vez más, que el agonista selectivo de receptores δ , el SNC-80, indujo inhibiciones tanto de FADD como de agregados de Fas (trímeros) en cerebro.

En contraste a los efectos observados para los tratamientos agudos con agonistas μ -, δ -, y κ -opioides sobre el contenido de FADD en cerebro (inhibición), la administración crónica (5 días) de morfina, SNC-80 y U50488H resultó en la inducción de tolerancia a los efectos inhibitorios iniciales de estos fármacos, lo que probablemente refleja el correspondiente proceso de desensibilización del receptor descrito tras exposición repetida del agonista (Okura *et al.*, 2003; Liu-Chen, 2004; Dang y Williams, 2004). En ratas tolerantes a opiáceos μ - y δ -, pero no en κ -, la abstinencia precipitada por la administración del antagonista selectivo o la abstinencia espontánea indujeron un nuevo y sostenido estímulo inhibitorio sobre FADD (con una duración superior a 2 días en el caso de la abstinencia a morfina). Esta inhibición podría estar relacionada con el incremento en la liberación de encefalinas (ligandos endógenos para los receptores μ - y δ -opioides) observado en cerebro de ratas abstinentes a morfina crónica (Mas-Nieto *et al.*, 2002), que también muestran un mayor número de neuronas c-Fos-positivas finalmente identificadas como neuronas encefalinérgicas (Veinante *et al.*, 2003).

La disminución inducida por fármacos opiáceos sobre FADD podría relacionarse con estudios recientes que asocian dosis extra-analgésicas de opiáceos (efectos agudos) con efectos neuroprotectores o de promoción de supervivencia en varios sistemas (véase Tegeder y Geisslinger, 2004). Se sabe que en el SNC el receptor Fas y sus proteínas asociadas (FADD y caspasas efectoras) pueden inducir fenómenos de apoptosis (Felderhoff-Mueser *et al.*, 2000; Sastry y Rao, 2000) o, de manera contraria, desarrollar señales de supervivencia (e.g., crecimiento neuronal, Desbarats *et al.*, 2003). Como se ha mostrado en esta Tesis doctoral (véase el esquema presentado en el apartado Objetivos), la adicción a heroína/morfina, así como la abstinencia a opiáceos, en ratas se asoció con incrementos en la densidad de Fas (receptor nativo y complejos de monómeros relevantes

en la señalización de Fas) en cerebro. Sin embargo, la proteína FADD, que acopla el receptor Fas con la caspasa-8 y que transmite la señal de muerte, sigue una modulación opuesta (i.e., inhibición de FADD y no activación de caspasas 8/3). En conjunto, estos resultados sugieren que las posibles señales apoptóticas que pudieran iniciarse tras la activación de Fas (Tegeeder y Geisslinger, 2004) serían anuladas por una disminución en la transducción de la señal a través del FADD y las caspasas efectoras. Así, los resultados indican que la adicción a opiáceos en rata no se asocia con una activación sostenida y lineal de la vía de señalización del receptor Fas (Fas, FADD, caspasas efectoras).

REGULACIÓN DE FADD A TRAVÉS DE LA VÍA MAPK ERK1/2

En uno de los trabajos de esta Tesis doctoral se observó que en cerebro humano *postmortem* de adictos a opiáceos existía una aparente normalización en la señalización de la vía del AMPc (AC I, PKA, CREB y pCREB), mientras que la ruta de las quinasas mitogénicas (MAPK: Ras, Raf-1, MEK1/2, pMEK1/2, ERK1/2 y pERK1/2) estaba marcadamente inhibida, sobre todo en la expresión de las formas activas (discutido en otro apartado). Además, la pronunciada inhibición de pERK1/2 observada en cerebro de adictos a opiáceos (75-80%) también pudo cuantificarse en cerebro de ratas tratadas de manera crónica con morfina (60-70%). Experimentos *in vitro* demostraron que estos efectos de los μ -opiáceos fueron dependientes de la actividad del enzima MEK1/2, ya que el inhibidor específico PD98059 bloqueó el efecto estimulador de la morfina sobre pERK1/2 en células SH-SY5Y.

En este contexto, un descubrimiento relevante, por tratarse de una manipulación *in vivo*, fue la identificación de este mismo mecanismo molecular (activación de la señalización de ERK1/2 MAP quinasa) como responsable de la capacidad del agonista δ -opioide SNC-80 para disminuir el contenido de FADD en el cerebro. Así, el tratamiento de ratas con 20 mg/kg de SL 327 (una dosis que bloquea selectivamente la actividad MEK1/2 *in vivo* y que induce efectos neuroquímicos significativos en el SNC; véase Ferguson y Robinson, 2004), abolió la disminución producida sobre el FADD por el SNC-80 en la corteza cerebral y en el cuerpo estriado. Además, y como era de esperar, el SL 327 también fue capaz de bloquear la activación de ERK1/2, pero no la de MEK1/2, inducida por SNC-80. Estos resultados claramente demostraron la participación directa de las dos MAP quinasas (activación secuencial de MEK y ERK) en la regulación *in vivo* de FADD por el agonista δ -opioide SNC-80. Este mismo mecanismo molecular podría postularse para el efecto

inhibitorio de la morfina sobre el FADD, ya que este opiáceo también activó ERK1/2 en cerebro de rata y no fue capaz de hacerlo en células SH-SY5Y tras la inhibición (PD98059) de MEK1/2, como ya se ha mencionado (véase también apartado más abajo). Es de interés señalar que la inhibición de la señalización MAP quinasa con SL 327 no modificó las distintas formas de Fas en los mismos cerebros, lo que excluye alteraciones en la densidad de este receptor en la regulación directa de FADD.

En resumen, dado que la activación de ERK1/2 es crucial para poner en marcha varios mecanismos anti-apoptóticos (Wada y Penninger, 2004), incluyendo aquí la protección frente a la apoptosis mediada por Fas (Holmström *et al.*, 1999, 2000), podría concluirse que los fármacos opiáceos (en especial los agonistas δ -opioides) serían capaces de promover señales de supervivencia en el cerebro a través de la inhibición de FADD utilizando para ello un mecanismo dependiente de la activación de la señalización ERK1/2 (véase el esquema presentado en el apartado Objetivos). En este contexto, estudios recientes han demostrado que la activación de receptores δ -opioides puede proteger neuronas neocorticales de la excitotoxicidad glutamatérgica (Zhang *et al.*, 2000), así como inducir otros efectos citoprotectores (véase Barry y Zuo, 2005).

MODULACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN (AMPc, MAPK) Y DEL RECEPTOR FAS/FADD EN CEREBRO *POSTMORTEM* DE ADICTOS A OPIÁCEOS

Los resultados obtenidos para este apartado revelan que la adicción a opiáceos en humanos se asocia con una aparente normalización en el funcionamiento de los componentes de la vía de señalización AMPc (AC I, PKA, CREB y pCREB) y con una marcada disminución en la inmunodensidad de las formas activas de los enzimas clave de la vía de las MAPK (formas fosforiladas de MEK1/2 y ERK1/2) en la corteza prefrontal. Esta región cerebral es de interés en el contexto de la adicción a opiáceos ya que está relacionada con el sistema de recompensa mesolímbico dopaminérgico. La desregulación descrita en la señalización de la vía de las MAPK (menor activación de ERK1/2) podría ser de relevancia en la modulación a largo plazo de varias formas de plasticidad sináptica descritas para la adicción a opiáceos (Nestler, 2001, 2002; Mazzucchelli *et al.*, 2002), aunque la marcada inhibición de esta vía en cerebro de adictos podría contrarrestar los efectos anti-apoptóticos de una inhibición de FADD (véase más adelante).

Los estudios que han examinado los efectos de los fármacos opiáceos sobre la vía de señalización del AMPc han producido resultados mixtos (Liu y Anand, 2001; Williams *et al.*, 2001) pero, en general, el tratamiento crónico con morfina se ha asociado con un incremento compensatorio de este sistema en regiones específicas del cerebro de rata. En el locus coeruleus de ratas tratadas con morfina crónica y/o abstinentes a opiáceos se encontraron incrementadas las proteínas G α i/o (Lane-Ladd *et al.*, 1997), la actividad AC (Duman *et al.*, 1988; Lane-Ladd *et al.*, 1997), la PKA C α (Lane-Ladd *et al.*, 1997), la proteína CREB y la tasa de fosforilación de CREB (Guitart *et al.*, 1992; Widnell *et al.*, 1994). En otras regiones cerebrales, como en el sistema límbico y en el cuerpo estriado de ratas, se describió un modesto incremento en alguno de estos componentes o incluso una disminución de CREB (véase Widnell *et al.*, 1996). En contraste con estos datos, y en línea con los resultados presentados en esta Tesis doctoral en cerebro humano, la adicción a opiáceos en ratones no alterados genéticamente (“wild-type”) no resultó en la activación de la vía de señalización del AMPc en corteza y cuerpo estriado (proteínas G α i1/2, PKA, pCREB; García-Sevilla *et al.*, 2004), donde se han cuantificado las mayores densidades de CREB, y de su forma activa (por fosforilación en su lugar de activación en el residuo Ser 133; Blom *et al.*, 2002). Además, los incrementos inducidos en corteza cerebral de ratón por el tratamiento crónico con morfina sobre la actividad AC y sobre el contenido de AMPc fueron muy modestos, incluso tras la abstinencia al opiáceo (aproximadamente de un 10%; Maldonado *et al.*, 1996; Mamiya *et al.*, 2001). De manera similar, la morfina crónica tampoco incrementó la PKA C α en el locus coeruleus de ratones (Akbarian *et al.*, 2002). Otros resultados farmacológicos indicaron que el tratamiento agudo con morfina se asoció con una disminución en el contenido de pCREB en el locus coeruleus de rata (Guitart *et al.*, 1992), aunque este estudio no midió directamente la fosforilación de CREB en la Ser 133. En trabajos más recientes se observó un marcado incremento en la fosforilación de CREB en la Ser 133 en células NG108-15 por morfina y por el agonista δ -selectivo [D-Pen^{2,5}]-encefalina (Bilecki *et al.*, 2000). Sin embargo, en cultivos primarios de estriado de rata, la morfina aguda y crónica no alteró CREB, ni el contenido total ni la fosforilación de la proteína, y la abstinencia precipitada por naloxona incrementó modestamente la actividad (estado de fosforilación) de este factor de transcripción (Chartoff *et al.*, 2003). Por tanto, parece que los tratamientos con opiáceos y/o la abstinencia a los mismos se podrían asociar con la activación de CREB en algunas células neuronales y en tejido cerebral de rata. Sin embargo, pCREB no se encontró incrementado

en la corteza cerebral de ratones dependientes de morfina (García-Sevilla *et al.*, 2004), y en varias regiones cerebrales (inclusive la corteza) se observó una inducción muy modesta de los elementos de respuesta nuclear al AMPc (CREs), mientras que en la abstinencia a opiáceos se indujo un incremento prominente de CRE (Shaw-Lutchman *et al.*, 2002).

Esta aparente falta de regulación sobre la vía del AMPc después de una exposición prolongada a opiáceos podría estar relacionada con la diferente sensibilidad entre especies (humano y ratón *versus* rata) y/o con diferencias entre regiones cerebrales (la corteza presenta mayor heterogeneidad celular), aunque la vía de señalización de las MAPK (resultados de este estudio) y otros marcadores relevantes de la adicción a opiáceos (Ferrer-Alcón *et al.*, 2003, 2004) fueron claramente modulados en la corteza prefrontal de los mismos sujetos adictos a opiáceos. En un estudio reciente en cerebro de adictos a heroína (Shichinohe *et al.*, 2001), la AC-I disminuyó en la corteza temporal pero no en el núcleo accumbens, lo que sugirió que esta enzima podría estar regulada de manera diferente en distintas áreas del cerebro en la adicción a opiáceos. De manera alternativa, la aparente normalización en la señalización del AMPc en cerebro de adictos crónicos a opiáceos (resultados de este estudio) podría sugerir que este sistema, quizá tras una alza en su regulación inicial, ha adquirido un estado estacionario en el que la señalización del receptor opioide a través de esta vía fuera de nuevo normosensible. Así, en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos se ha observado una estimulación normal de la unión de [³⁵S]-GTPγS por el agonista μ-opioide DAMGO (Meana *et al.*, 2000) con un incremento en la densidad de proteínas Gαi/o (Escribá *et al.*, 1994).

En contraste con lo observado para la vía del AMPc, los resultados de este estudio revelaron que la adicción a opiáceos en humanos disminuyó las inmunodensidades de los principales componentes de la cascada de las MAPK (c-Raf-1/pMEK/pERK) en cerebro (corteza prefrontal). Esta pronunciada inhibición de pERK1/2 (75-80%) también se observó en cerebro de ratas tratadas de manera crónica con morfina (60-70%). Además, como se ha comentado, estos efectos de los opiáceos fueron dependientes de la actividad del enzima MEK, ya que un inhibidor específico de MEK, el PD98059, bloqueó el efecto estimulador de la morfina sobre pERK1/2 en células SH-SY5Y. Estos resultados van en línea con observaciones previas que indicaron que las MAPKs estaban involucradas en la señalización del receptor μ/δ-opioide en cerebro (Ortiz *et al.*, 1995; Berhow *et al.*, 1996; Gutstein *et al.*, 1997; Schulz y Höllt, 1998; Eitan *et al.*, 2003; Lesscher *et al.*, 2003), y que la activación aguda de pERK1/2 estaba mediada por proteínas Gαi/o inhibitorias (Zhang *et*

al., 2003). En un estudio de inmunohistoquímica reciente (Eitan *et al.*, 2003), el tratamiento agudo con morfina en ratones (10-100 mg/kg) resultó en incrementos de pERK1/2 en el locus coeruleus y en las áreas de proyección del neocortex (e.g., cortex cingulato anterior), y en disminuciones de estas pMAPKs en el núcleo accumbens y en la amígdala central, lo que demostró mecanismos específicos de regulación de estas enzimas dependiendo de la región cerebral tras la administración aguda del opiáceo. El tratamiento crónico con morfina (10-40 mg/kg durante 6 días) resultó en el desarrollo de tolerancia a la modulación de pERK1/2 inducida por el opiáceo (Eitan *et al.*, 2003). La inhibición sobre pMEK/pERK observada en los adictos a opiáceos, fallecidos por una sobredosis de opiáceo (heroína o metadona), podría relacionarse, en parte, con la dosis letal de opiáceo que les causó muerte, y estar observando entonces el efecto agudo de la última dosis letal. Sin embargo, el tratamiento agudo en ratas con morfina se asoció con un incremento en la inmunodensidad de pERK1/2 (dos veces), sin provocar cambios en el contenido total de ERK, en corteza cerebral. Por lo tanto parece que, en vez de un posible efecto estimulante debido a la sobredosis letal de opiáceo, la potente represión observada sobre la activación de pMEK1/2 y pERK1/2 en cerebros de adictos a opiáceos (corteza prefrontal) sea el resultado neto del efecto crónico del opiáceo (véase Schulz y Höllt, 1998).

La cascada de señalización MAPK ERK1/2 parece jugar un papel importante en varias formas de plasticidad sináptica a largo plazo en cerebro, ya que coordina respuestas entre receptores de superficie membranal y segundos mensajeros neuronales (Derkinderen *et al.*, 1999; Grewal *et al.*, 1999; Sweatt, 2001; Adams y Sweatt, 2002; Mazzucchelli *et al.*, 2002; Pouyssegur y Lenormand, 2003). Por lo tanto, la inhibición observada sobre pMEK/pERK1/2 podría tener relevancia a la hora de modular el desarrollo de la plasticidad neuronal asociada con la adicción a opiáceos en humanos. En este contexto, los efectos de ERK1/2 sobre dos de sus dianas tienen especial interés: la inducción de la fosforilación de las proteínas del neurofilamento (NF-H, NF-M) (Veeranna *et al.*, 1998) y la activación de p35, el activador específico neuronal de la quinasa dependiente de ciclina-5 (cdk-5: “cyclin-dependent kinase-5”; Harada *et al.*, 2001; Veeranna *et al.*, 2000), que a su vez también fosforila los neurofilamentos (Pant *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 2001) que conforman la arquitectura funcional de la neurona madura. En cerebros de adictos a opiáceos el contenido de NF-H fosforilado está incrementado, así como también la relación entre las formas fosforiladas y no fosforiladas de NF-H (Ferrer-Alcón *et al.*, 2000, 2003). Además, en la corteza prefrontal de sujetos adictos a opiáceos también se observó una

disminución del complejo cdk5/p35 y la existencia de una correlación positiva entre p35 y el NF-H fosforilado (Ferrer-Alcón *et al.*, 2003). Por lo tanto, la adicción crónica a opiáceos en humanos se asoció con importantes disminuciones en la actividad de ERK1/2 (resultados de este estudio), del complejo cdk5/p35 (Ferrer-Alcón *et al.*, 2003) y de las proteínas del NF no fosforiladas (NF-H, NF-L) (Ferrer-Alcón *et al.*, 2000), así como con una hiperfosforilación aberrante del NF-H (Ferrer-Alcón *et al.*, 2000, 2003) en cerebro. Estos cambios podrían tener consecuencias importantes en el desarrollo a largo plazo de varias formas de plasticidad neuronal asociadas con la adicción a opiáceos en humanos (Nestler, 2001, 2002). En este contexto, los ratones deficientes en el gen ERK1 (que presentaron por compensación una mayor señalización ERK2) mostraron mayor sensibilidad a las propiedades reforzantes conductuales de la morfina (Mazzucchelli *et al.*, 2002). Además, la inmunodensidad del factor de transcripción activado por ERK1/2, la proteína Elk-1, también se encontró disminuida (27%) en la corteza prefrontal de los mismos sujetos adictos a opiáceos (véase Anexo experimental II). Se sabe que las neuroadaptaciones a largo plazo causadas por exposiciones repetidas a drogas adictivas pueden depender críticamente de las alteraciones en la expresión génica (Jacobs *et al.*, 2005). Por lo tanto, la alteración observada para Elk-1 podría jugar un papel relevante en estas neuroadaptaciones a largo plazo.

Finalmente, se procedió al estudio de la modulación de los componentes de la vía de señalización iniciada a través del receptor Fas (formas glicosilada y agregadas de Fas, proteína transductora FADD, y caspasas efectoras 8 y 3) en dos grupos de sujetos adictos a opiáceos diferentes en cuanto a la duración de la adicción (“short-term abuse” y “long-term abuse”). La inmunodensidad de la proteína FADD se encontró disminuida de forma significativa en los dos grupos de adictos a opiáceos (31%, “short-term abuse” y 28%, “long-term abuse”). Por contra, el resto de los componentes de esta vía de señalización (FADD y caspasas efectoras 8 y 3) no se encontraron alterados en cerebros de adictos a opiáceos (véase Anexo experimental III).

No existen en la literatura científica datos sobre la modulación de esta vía apoptótica en cerebro de adictos humanos. Por ello, la discusión de los efectos de los opiáceos sobre el FADD en corteza prefrontal humana, tiene que justificarse mediante los efectos ya observados y discutidos en este trabajo de Tesis doctoral para otras especies animales (véase efectos de la adicción a opiáceos sobre FADD en cerebro de rata). Así, estos resultados sugieren que en cerebro de adictos crónicos a opiáceos, a diferencia de lo

observado en cerebro de rata, no se desarrolla un proceso de tolerancia a la reducción inicial de FADD (inhibición sostenida de la vía de señalización de Fas). Sin embargo, se podría considerar también el posible efecto (inhibidor) de la última dosis letal de opiáceo sobre la modulación observada en esta proteína, ya que al obtenerse la misma modulación sobre el FADD en los dos grupos de adictos a opiáceos, no se puede discernir del todo entre los efectos a corto y más largo plazo de los opiáceos sobre esta proteína. Asimismo cabe mencionar la aparente incongruencia al observar inhibida la activación de MEK/ERK1/2 (formas fosforiladas) y la reducción en densidad de FADD en cerebros de adictos humanos, sobre todo si se tiene en cuenta que el posible mecanismo anti-apoptótico mediado por FADD depende de la activación de ERK1/2. Sin embargo, resultados preliminares no presentados en esta Tesis indican que la fosforilación de FADD está incrementada en cerebro de ratas adictas a opiáceos, siendo ésta la forma activa de FADD y la que se ha descrito con mayor relevancia en los fenómenos anti-apoptóticos celulares (Lambert *et al.*, 2003).

El hecho de no encontrarse alterada la inmunodensidad del receptor Fas (forma glicosilada y agregados) ni las caspasas 8 y 3 en cerebro de estos sujetos adictos a opiáceos, aporta aún una mayor importancia a la modulación observada sobre el FADD durante la adicción a opiáceos. Además, el FADD se ha visto que está tónicamente regulado por opioides endógenos actuando sobre el receptor δ -opioide y que este receptor se ha asociado últimamente con efectos anti-apoptóticos o de supervivencia celular, y que a través de su conexión con la vía de las MAPK (ERK1/2) podría estar implicado en mecanismos de plasticidad neuronal, lo que da relevancia a los resultados de este trabajo de Tesis doctoral.

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones mayores de este trabajo de Tesis doctoral son:

1. La adicción a opiáceos en cerebro de rata se asocia con incrementos en la densidad del receptor apoptótico Fas y con decrementos de la proteína FADD, transductora de la señal de muerte, sin que además se alteren las caspasas efectoras 8 y 3, lo que sugiere que los procesos de adicción a estos fármacos no están asociados con la inducción de apoptosis cerebral mediados por esta vía.
2. La modulación de Fas (receptor nativo) por opiáceos depende mayormente del receptor μ -opioide, y la regulación de sus formas agregadas (trímeros relevantes en el inicio de la señalización) así como la de FADD se asocia con el receptor δ -opioide, lo que demuestra una modulación diferencial de los componentes de esta vía por el sistema opioide que podría tener repercusiones terapéuticas.
3. La modulación inhibitoria de FADD por agonistas δ -opioáceos es dependiente, a través de un mecanismo indirecto, de la activación de las quinasas MAPK ERK1/2, vía de señalización que a su vez se ha relacionado con la regulación de varios mecanismos anti-apoptóticos.
4. La adicción a opiáceos en cerebro humano se asocia con una disminución en la densidad de FADD en la corteza prefrontal (efectos a corto y largo plazo) sin que se alteren las diversas formas del receptor Fas y ciertas caspasas efectoras, lo que de nuevo demuestra una probable menor actividad de esta proteína acopladora de Fas en este modelo humano de adicción a opiáceos.
5. La adicción a opiáceos en cerebro humano (efectos a largo plazo) también se asocia con una aparente normalización de los componentes de la vía de señalización del AMPc (AC I, PKA, CREB y pCREB) y con una marcada inhibición de la vía de las MAPK (formas fosforiladas de MEK y de ERK1/2), lo que sugiere la inducción de alteraciones de plasticidad neuronal en estos cerebros humanos.
6. En su conjunto, los resultados de esta Tesis demuestran la clara participación del complejo Fas/FADD en la adicción a opiáceos, tanto en los procesos de tolerancia como de dependencia física, lo que añade un nuevo nivel de complejidad a la señalización de los receptores opioides, probablemente mediatizando efectos no-apoptóticos relacionados con fenómenos de plasticidad neuronal.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbracchio MP, Ongini E, Memo M. Disclosing apoptosis in the CNS. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 129-131 (1999)
- Adachi M, Suematsu S, Kondo T, Ogasawara T, Tanaka T, Yoshida N, Nagata S. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nature Gen.* 11: 294-300 (1995)
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326 (1998)
- Adams JP, Sweatt JD. Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 135-163 (2002)
- Akbadian S, Rios M, Liu R-J, Gold SJ, Fong H-F, Zeiler S, Coppola V, Tessarollo L, Jones KR, Nestler EJ, Aghajanian GK, Jaenisch R. Brain-derived neurotrophic factor is essential for opiate-induced plasticity of noradrenergic neurons. *J. Neurosci.* 22: 4153-4162 (2002)
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270: 27489-27494 (1995)
- Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell. Biol.* 22: 207-220 (2002)
- Ammon S, Mayer P, Riechert U, Tischmeyer H, Höllt V. Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal. *Mol. Brain. Res.* 112: 113-125 (2003)
- Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27: 199-214 (2003)
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*: 281, 1305-1308 (1998)
- Badorff C, Ruetten H, Mueller S, Stahmer M, Gehring D, Jung F, Ihling C, Zeiher AM, Dimmeler S. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 β and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J. Clin. Invest.* 109: 373-381(2002)
- Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Sem. Immunol.* 15: 185-193 (2003)
- Barry U, Zuo Z. Opioids: Old drugs for potential new applications. *Curr. Pharm. Des.* 11: 1343-1350 (2005)
- Bailey CP, Connor M. Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 60-68 (2005)
- Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain. *Glia* 27: 62-74 (1999)
- Beitner-Johnson D, Guitart X, Nestler EJ. Neurofilament proteins and the mesolimbic dopamine system: common regulation by chronic morphine and chronic cocaine in the rat ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 12: 2165-2176 (1992)
- Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ. Regulation of ERK (extracellular signal-regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic

- dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J. Neurosci.* 16: 4707-4715 (1996)
- Bilecki W, Höllt V, Przewlocki R. Acute δ -opioid receptor activation induces CREB phosphorylation in NG108-15 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 390: 1-6 (2000)
- Blendy JA, Maldonado R. Genetic analysis of drug-addiction: the role of cAMP response element binding protein. *J. Mol. Med.* 76: 104-110 (1998)
- Blom JMC, Tascadda F, Carra S, Ferraguti C, Barden N, Brunello N. Altered regulation of CREB by chronic antidepressant administration in the brain of transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *Neuropsychopharmacology* 26: 605-614 (2002)
- Boronat MA, Olmos G, García-Sevilla JA. Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease of neurofilament proteins by idazoxan and other I_2 -imidazoline ligands. *Br. J. Pharmacol.* 125: 175-185 (1998)
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
- Brandt MR, Furness MS, Rice KC, Fischer BD, Negus S. Studies of tolerance and dependence with the δ -opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys responding under a schedule of food presentation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299: 629-637 (2001)
- Budd, R.C. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation* 109: 437-442 (2002)
- Burek MJ, Oppenheim RW. Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol.* 6: 427-46 (1996)
- Büttner A, Mall G, Penning R, Weis S. The neuropathology of heroin abuse. *Foren. Sci. Intern.* 113: 435-442 (2000)
- Calabrese EJ. Opiates: Biphasic dose responses. *Crit. Rev. Toxicol.* 31: 585-604 (2001a)
- Calabrese EJ. Apoptosis: Biphasic dose responses. *Crit. Rev. Toxicol.* 31: 607-613 (2001b)
- Chartoff EH, Papadopoulou M, Konradi C, Carlezon Jr WA. Dopamine-dependent increases in phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) during precipitated morphine withdrawal in primary cultures of rat striatum. *J. Neurochem.* 87: 107-118 (2003)
- Chatzaki E, Makrigiannakis A, Margioris AN, Kouimtzoglou E, Gravanis A. The Fas/FasL apoptotic pathway is involved in κ -opioid-induced apoptosis of human endometrial stromal cells. *Mol. Human. Reprod.* 7: 867-874 (2001)
- Cheema ZF, Wade SB, Sata M, Walsh K, Sohrabji F, Miranda RC. Fas/Apo [apoptois]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: Induction of caspase-dependent cell death and activation of NF- κ B. *J. Neurosci.* 19: 1754-1770 (1999)
- Choi C, Park JY, Lee J, Lim J-H, Shin E-C, Ahn Y, Kim C-H, Kim S-J, Kim J-D, Choi IS, Choi I-H. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- α , or IFN- γ . *J. Immunol.* 162: 1889-1895 (1999)
- Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71: 479-500 (1999)

- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1-16 (1997)
- Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DD, Stanfield BB. Regressive events in neurogenesis. *Science* 225: 1258-65 (1984)
- Craft RM, McNeil DM. Agonist/antagonist properties of nalbuphine, butorphanol and (-)-pentazocine in male vs. female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75: 235-245 (2003)
- Cvejic S, Devi L. Dimerization of the δ -opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 272: 26959-26964 (1997)
- Dang VC, Williams JT. Chronic morphine treatment reduces recovery from opioid desensitization. *J. Neurosci.* 24: 7699-7706 (2004)
- Dawson G, Dawson SA, Goswami R. Chronic exposure to κ -opioids enhances the susceptibility of immortalized neurons (F-11 k7) to apoptosis-inducing drugs by a mechanism that may involve ceramide. *J. Neurochem.* 68: 2363-2370 (1997)
- Derkinderen P, Enslen H, Girault J-A. The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *NeuroReport* 10: R24-R34 (1999)
- Desbarats J, Birge RB, Minouni-Rongy M, Weistein DE, Palerme J-S, Newell MK. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nature Cell Biol* 5: 118-125 (2003)
- Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, Grütter MG. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol. Cell.* 11: 543-549 (2003)
- Duman RS, Tallman JF, Nestler EJ. Acute and chronic opiate-regulation of adenylate cyclase in brain: specific effects in locus coeruleus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 1033-1039 (1988)
- Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97: 7579-7584 (2000)
- Eitan S, Bryant CD, Saliminejad N, Yang YC, Vojdani E, Keith Jr D, Polakiewicz R, Evans CJ. Brain region-specific mechanisms for acute morphine induced mitogen-activated protein kinase modulation and distinct patterns of activation during analgesic tolerance and locomotor sensitization. *J. Neurosci.* 23: 8360-8369 (2003)
- Escribá PV, Sastre M, García-Sevilla JA. Increased density of guanine nucleotide-binding proteins in the postmortem brain of heroin addicts. *Arch. Gen Psychiatry* 51: 494-501 (1994)
- Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258: 1952-5 (1992)
- Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 6: 322-327 (2005)
- Felderhoff-Mueser U, Taylor DL, Greenwood K, Kozma M, Stibenz D, Joashi UC, Edwards AD, Mehmet H. Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain. Pathol.* 10: 17-29 (2000)
- Ferguson SM, Robinson TE. Amphetamine-evoked gene expression in striatopallidal neurons: regulation by corticostriatal afferents and the ERK/MAPK signaling cascade. *J Neurochem.* 91: 337-348 (2004)

- Ferrer-Alcón M, García-Sevilla JA, Jaquet PE, La Harpe R, Riederer BM, Walzer C, Guimon J. Regulation of nonphosphorylated and phosphorylated forms of neurofilament proteins in the prefrontal cortex of human opioid addicts. *J. Neurosci. Res.* 61: 338-349 (2000)
- Ferrer-Alcón M, La Harpe R, Guimón J, García-Sevilla JA. Down-regulation of neuronal cdk5/p35 in opioid addicts and opiate-treated rats: Relation to neurofilament phosphorylation. *Neuropsychopharmacology* 28: 947-955 (2003)
- Ferrer-Alcón F, La Harpe R, García-Sevilla JA. Decreased immunodensities of μ -opioid receptors, receptor kinases GRK 2/6 and β -arrestin-2 in postmortem brains of opiate addicts. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 121: 114-122 (2004)
- Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat. Genet.* 25: 195-200 (2000)
- Franco R, Casadó V, Mallol J, Ferré S, Fuxe K, Cortés A, Ciruela F, Lluís C, Canela EI. Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors. *Trends in Biochemical Sciences*. En prensa (2005)
- García-Sevilla JA, Ventayol P, Busquets X, La Harpe R, Walzer C, Guimon J. Marked decrease of immunolabelled 68 kDa neurofilament (NF-L) proteins in brains of opiate addicts. *NeuroReport* 8: 1561-1570 (1997)
- García-Sevilla JA, Ferrer-Alcón F, Martín M, Kieffer BL, Maldonado R. Neurofilament proteins and cAMP pathway in brains of μ -, δ - or κ -opioid receptor gene knock-out mice: Effects of chronic morphine administration. *Neuropharmacology* 46: 519-530 (2004)
- Gómez-Angelats M, Cidlowski JA. Molecular evidence for the nuclear localization of FADD. *Cell. Death. Differ.* 10: 791-797 (2003)
- Goswami R, Dawson SA, Dawson G. Cyclic AMP protects against staurosporine and wortmannin-induced apoptosis in both embryonic and immortalized (F-11 k7) neurons. *J. Neurochem.* 70: 1376-1382 (1998)
- Grange-Midroit M, García-Sevilla JA, Ferrer-Alcón M, La-Harpe R, Walzer C, Guimón J. G protein-coupled receptor kinases, beta-arrestin-2 and associated regulatory proteins in the human brain: postmortem changes, effect of age and subcellular distribution. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 101: 39-51 (2002)
- Grant P, Sharma P, Pant HC. Cyclin-dependent protein kinase 5 (CDK5) and the regulation of neurofilament metabolism. *Eur. J. Biochem.* 268: 1534-1546 (2001)
- Grewal SS, York RD, Stork PJS. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 544-553 (1999)
- Guitart X, Thompson MA, Mirante CK, Greenberg ME, Nestler EJ. Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *J. Neurochem.* 58: 1168-1171 (1992)
- Gupta S. Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. *J. Clin. Immunol.* 20: 229-39 (2000)
- Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* 69: 2957-64 (2001a)

- Gupta S. Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr. Mol. Med.* 1: 317-24 (2001b)
- Gupta K, Kshirsagar S, Chang L, Schwartz R, Law PY, Yee D, Hebbel RP. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Res.* 62: 4491-4498 (2002)
- Gutstein HB, Rubie EA, Mansour A, Akil H, Woodgett JR. Opioid effects on mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Anesthesiology* 87: 1118-1126 (1997)
- Gutstein HB, Akil H. Opioid Analgesics. En capítulo 23: 569-619, Goodman y Gilman's, X edición, Mc GrawHill (2001)
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274: 1363-6 (1996)
- Harada T, Morooka T, Ogawa S, Nishida E. ERK induces p35, a neuron-specific activator of cdk5, through induction of Egr1. *Nature Cell. Biol.* 3: 453-459 (2001)
- Hassouna I, Wickert H, Zimmermann M, Gillardon F. Increase in Bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice. *Neurosci. Lett.* 204: 85-88 (1996)
- He J, Xu J, Castleberry AM, Lau AG, Hall RA. Glycosylation of β_1 -adrenergic receptors regulates receptor surface expression and dimerization. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297: 565-572 (2002)
- Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, Wicovsky A, Peters N, Warnke C, Pfizenmaier K, Wajant H. The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J. Cell. Biol.* 168: 1087-1098 (2005)
- Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336 (1990)
- Holmström TH, Tran SEF, Johnson VL, Ahn NG, Chow SC, Eriksson JE. Inhibition of mitogen-activated kinase signaling sensitizes HeLa cells to Fas receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5991-6002 (1999)
- Holmström TH, Schmitz I, Söderström TS, Poukkula M, Johnson VL, Chow SC, Krammer PH, Eriksson JE. MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J.* 19: 5418-5428 (2000)
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S-I, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233-243 (1991)
- IUPHAR, "International Union of Pharmacology, Opioid Receptors" en www.iuphar.org
- Jacobs E, Smit A, de Vries T, Schoffelmeer A. Long-term gene expression in the nucleus accumbens following heroin administration is subregion-specific and depends on the nature of drug administration. *Addict Biol.* 10: 91-100 (2005)
- Jaquet PJ, Ferrer-Alcón M, Ventayol P, Guimón J, García-Sevilla JA. Acute and chronic effects of morphine and naloxone on the phosphorylation of neurofilament-H proteins in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 304: 37-40 (2001)

- Kamitani T, Nguyen HP, Yeh ETH. Activation-induced aggregation and processing of the human fas antigen. Detection with cytoplasmic domain-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 272: 22307-22314 (1997)
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-57 (1972)
- Khotib J, Narita M, Suzuki M, Yajima Y, Suzuki T. Functional interaction among opioid receptor types: up-regulation of μ - and δ -opioid receptor functions after repeated stimulation of κ -opioid receptors. *Neuropharmacology* 46: 531-540 (2004)
- Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology* 66: 285-306 (2002)
- Kim CN, Wang X, Huang Y, Ibrado AM, Liu L, Fang G, Bhalla K. Overexpression of Bcl-X(L) inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res.* 57: 3115-20 (1997)
- Kinloch RA, Treherne JM, Furness LM, Hajimohamadreza I. The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 35-42 (1999)
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14: 5579-5588 (1995)
- Kitchen I, Slowe SJ, Matthes HWD, Kieffer BL. Quantitative autoradiographic mapping of μ -, δ - and κ -opioid receptors in knockout mice lacking the μ -opioid receptor gene. *Brain Research* 778: 73-88 (1997)
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-6 (1997)
- Kolch W, Calder M, Gilbert D. When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Lett.* 579: 1891-1895 (2005)
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-8 (1997)
- Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795 (2000)
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 18: 44-51 (1997)
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5 (1970)
- Lambert C, Landau AM, Desbarats J. Fas-beyond death: A regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* 8: 551-562 (2003)
- Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, Pfeuffer T, Krupinski J, Aghajanian GK, Nestler EJ. CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J. Neurosci.* 17: 7890-7901 (1997)
- Law P-Y, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol.* 40: 389-430 (2000)

- Lee SP, O'Dowd BF, Rajaram RD, Nguyen T, George SR. D2 Dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4. *Biochemistry* 42: 11023-11031 (2003)
- Lesscher HMB, Burbach JPH, Van Ree JM, Gerrits MAFM. ERK1/2 activation in rat ventral tegmental area by the μ -opioid agonist fentanyl : an in vitro study. *Neuroscience* 116: 139-144 (2003)
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501 (1998)
- Liao D, Lin H, Yee Law P, Loh HH. Mu-opioid receptors modulate the stability of dendritic spines. *PNAS* 102: 1725-1730 (2005)
- Linden R. The survival of developing neurons: a review of afferent control. *Neuroscience* 58: 671-82 (1994)
- Lindsay RM. Adult rat brain astrocytes support survival of both NGF-dependent and NGF-insensitive neurones. *Nature* 282: 80-2 (1979)
- Liu J-G, Anand KJS. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res. Rev.* 38: 1-19 (2001)
- Liu-Chen L-Y. Agonist-induced regulation and trafficking of κ opioid receptors. *Life Sci.* 75: 511-536 (2004)
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-9 (1977)
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-90 (1998)
- Ma W, Zheng WH, Powell K, Jhamandas K, Quirion R. Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1091-1104 (2001)
- MacEwan DJ. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. *Br. J. Pharmacol.* 135: 855-875 (2002)
- Maharajan P, Prencipe R, Falchetti R, Di Francesco P, Paino G, Maharajan V. Chronic morphine alters calbindin D-28k immunostaining patterns in mouse forebrain. *Neurosci. Lett.* 243: 65-68 (1998)
- Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J, Schütz G. Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 273: 657-659 (1996)
- Mamiya T, Noda Y, Ren X, Hamdy M, Furukawa S, Kameyama T, Yamada K, Nabeshima T. Involvement of cyclic AMP systems in morphine physical dependence in mice: prevention of development of morphine dependence by rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* 132: 1111-1117 (2001)

- Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *J. Neurosci.* 22: 7650-7661 (2002)
- Marie-Claire C, Courtin C, Roques BP, Noble F. Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. *Neuropsychopharmacology* 29: 2208-2215 (2004)
- Martin WR. Opioid antagonists. *Pharmacol. Rev.* 19: 463-521 (1967)
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197: 517-32 (1976)
- Mas Nieto M, Wilson J, Cupo A, Roques BP, Noble F. Chronic morphine treatment modulates the extracellular levels of endogenous enkephalins in rat brain structures involved in opiate dependence: A microdialysis study. *J. Neurosci.* 22: 1034-1041 (2002)
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383: 819-23 (1996)
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pagès G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrengruber MU, Cestari V, Lipp H-P, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34: 807-820 (2002)
- McPherson GA. Computer-assisted analysis of complex concentration-response data. *J. Pharmacol. Methods* 13: 125-34 (1985)
- McClure SJ, Robinson PJ. Dynamin, endocytosis and intracellular signalling. *Mol. Mem. Biol.* 13: 189-215 (1996)
- Meana JJ, González-Maeso J, García-Sevilla JA, Guimón J. μ -Opioid receptor and α_2 -adrenoceptor agonist stimulation of [35 S]GTP γ S binding to G-proteins in postmortem brains of opioid addicts. *Mol. Psychiatry* 5: 308-315 (2000)
- Mei J, Pasternak W. Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma $_1$ receptor. *Biochem. Pharmacol.* 62: 349-355 (2001)
- Mei J, Pasternak W. σ_1 Receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300:1070-1074 (2002)
- Milanés MV, Laorden ML. Effects of U-50,488H withdrawal on catecholaminergic neurones of the rat ventricle. *Br. J. Pharmacol.* 124: 1060-1064 (1998)
- Minami M, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Nakamura S, Onogi T, Kaneko S, Satoh M. Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. *FEBS Lett.* 329: 291-5 (1993)
- Motulsky HJ, Ransnas LA. Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *Faseb J.* 1: 365-74 (1987)
- Mundle S, Raza A. Defining the dynamics of self-assembled Fas-receptor activation. *TRENDS in Immunology* 23: 187-194 (2002)

- Murray SR, Evans CJ, Zastrow Von M. Phosphorylation is not required for dynamin-dependent endocytosis of a truncated mutant opioid receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 24987-24991 (1998)
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456 (1995)
- Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33: 29-55 (1999)
- Negus SS, Brandt MR, Gatch MB, Mello NK. Effects of heroin and its metabolites on schedule-controlled responding and thermal nociception in rhesus monkeys: Sensitivity to antagonism by quadazocine, naltrindole and β -funaltrexamine. *Drug Alcohol. Depend.* 70: 17-27 (2003)
- Nestler EJ. Under siege: the brain on opiates. *Neuron* 16: 897-900 (1996)
- Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278: 58-63 (1997)
- Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Rev. Neurosci.* 2: 119-128 (2001)
- Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol. Learn. Memo.* 78: 637-647 (2002)
- Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47: 24-32 (2004)
- Ng GYK, O'Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P, George SR. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 227, 200-204 (1996)
- Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev. Neurosci.* 23: 73-87 (2000)
- Noble F, Szücs M, Kieffer B, Roques BP. Overexpression of dynamin is induced by chronic stimulation of μ - but not δ -opioid receptors: Relationship with μ -related morphine dependence. *Mol. Pharmacol.* 58: 159-166 (2000)
- Nordeen EJ, Nordeen KW, Sengelaub DR, Arnold AP. Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science* 229: 671-3 (1985)
- O'Brien CP. Drug Addiction and Drug Abuse. En capítulo 24: 621-642, Goodman y Gilman's, X edición, Mc GrawHill (2001)
- Odagaki Y, García-Sevilla JA, Huguelet P, La Harpe R, Koyama T, Guimón J. Cyclic AMP-mediated signaling components are upregulated in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Brain Res.* 898: 224-231 (2001)
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth B, Ponstingl H, Krammer P. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family. *J. Biol. Chem.* 267: 10709-10715 (1992)
- Okado N, Oppenheim RW. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord IX. The loss of motoneurons following removal of afferent inputs. *J. Neurosci.* 4: 1639-52 (1984)
- Okura T, Varga EV, Hosohata Y, Navratilova E, Cowell SM, Rice K, Nagase H, Hruby VJ, Roeske WR, Yamamura HI. Agonist-specific down-regulation of the human δ -opioid receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 459: 9-16 (2003)

- Oppenheim RW. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. V. Evidence on the role of cell death and neuromuscular function in the formation of specific peripheral connections. *J. Neurosci.* 1: 141-51 (1981)
- Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 453-501 (1991)
- Orlinick JR, Vaishnav AK, Elkon KB. Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int. Rev. Immunol.* 18: 293-308 (1999)
- Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ. Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain : regional distribution and regulation by chronic morphine. *J. Neurosci.* 15: 1285-1297 (1995)
- Ozaita A, Escribá PV, García-Sevilla JA. The alkylating agent EEDQ facilitates protease-mediated degradation of the human brain α_{2A} -adrenoceptor as revealed by a sequence-specific antibody. *Neurosci. Lett.* 263: 105-108 (1999)
- Pant AC, Veeranna GJ, Pant HC, Amin N. Phosphorylation of human high molecular weight neurofilament protein (hNF-H) by neuronal cyclin-dependent kinase 5 (cdk5). *Brain Res.* 765: 259-266 (1997)
- Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MA, Di Leve G, Signore A, Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J. Biol. Chem.* 274: 38241-38250 (1999)
- Patel M, Gomes B, Patel V, Yoburn BC. Antagonist-induced μ -opioid receptor up-regulation decreases G-protein receptor kinase-2 and dynamin-2 abundance in mouse spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.* 446: 37-42 (2002)
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-E, Karandikar M, Berman K, Coob MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22: 153-183 (2001)
- Pettmann B, Henderson CE. Killer wiles: growing interest in Fas. *Nat. Cell. Biol.* 5: 91-2 (2003)
- Pezawas LM, Fischer G, Diamant K, Scheider C, Schindler SD, Thurnher M, Ploechl W, Eder H, Kasper S. Cerebral CT findings in male opioid-dependent patients: stereological, planimetric and linear measurements. *Psychiatry Res. (Neuroimaging Sect.)* 83: 139-147 (1998)
- Pierce KL, Lefkowitz RJ. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 727-733 (2001)
- Pouysségur J, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur. J. Biochem.* 270: 3291-3299 (2003)
- Quirion R, Bowen WD, Itzhak Y, Junien JL, Musacchio JM, Rothman RB, Su T-P, Tam SW, Taylor DP. A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 85-86 (1992)
- Raoul C, Estévez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyrière O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas: Potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35: 1067-1083 (2002)

- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol. Pharmacol.* 45: 330-334 (1994)
- Reed JC. Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell* 91: 559-62 (1997)
- Robinson TE, Kolb B. Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse* 33: 160-162 (1999)
- Salahpour A, Bonin H, Bhalla S, Petäjä-Repo U, Bouvier M. Biochemical characterization of β_2 -adrenergic receptor dimers and oligomers. *Biol. Chem.* 384: 117-123 (2003)
- Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74: 1-20 (2000)
- Scaffidi C, Volkland J, Blomberg I, Hoffmann I, Krammer PH, Peter ME. Phosphorylation of FADD/MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J. Immunol.* 164: 1236-1242 (2000)
- Scherle PA, Ma W, Lim H, Dey S, Traskos JM. Regulation of cyclooxygenase-2 induction in the mouse uterus during decidualization. *J. Biol. Chem.* 275: 37086-37092 (2000)
- Schuller AGP, King MA, Zhang J, Bolan E, Pan Y-X, Morgan DJ, Chang A, Czick ME, Unterwald EM, Pasternak GW, Pintar JE. Retention of heroin and morphine-6 β -glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nature Neurosci.* 2: 151-156 (1999)
- Schulz S, Höllt V. Opioid withdrawal activates MAP kinase in locus coeruleus neurons in morphine-dependent rats in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 10: 1196-1201 (1998)
- Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, Jiang RF, Markos K, Davidson W, Scott DW, Shi YF. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther.* 88, 333-47 (2000)
- Shaw-Lutchman TZ, Barrot M, Wallace T, Gilden L, Zachariou V, Impey S, Duman RS, Storm D, Nestler EJ. Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. *J. Neurosci.* 22: 3663-3672 (2002)
- Shichinohe S, Ozawa H, Hashimoto E, Tatschner T, Riederer P, Saito T. Changes in the cAMP-related signal transduction mechanism in postmortem human brains of heroin addicts. *J. Neural. Transm.* 108: 335-347 (2001)
- Siegel RM, Ka-Ming Chang F, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature Immunol.* 1: 469-474 (2000)
- Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Ka-Ming Chang F, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288: 2354-2357 (2000a)
- Simonato M. The neurochemistry of morphine addiction in the neocortex. *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 410-415 (1996)
- Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A, LeMeur M, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL. Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J.* 17: 886-897 (1998)

- Singhal PC, Sharma P, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N. Morphine enhances macrophage apoptosis. *J. Immunol.* 160: 1886-1893 (1998)
- Singhal PC, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N, Ding G. Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. *J. Leukoc. Biol.* 66: 650-658 (1999)
- Singhal PC, Bhaskaran M, Patel J, Patel K, Kasinath BS, Duraisamy S, Franki N, Reddy K, Kapasi AA. Role of P38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Fas-Fas ligand interaction in morphine-induced macrophage apoptosis. *J. Immunol.* 168: 4025-4033 (2002)
- Sklair-Tavron L, Shi W-X, Lane SB, Harris HW, Bunney BS, Nestler EJ. Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11202-11207 (1996)
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85 (1985)
- Strand S, Galle PR. Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications. *Mol. Med. Today* 4: 63-8 (1998)
- Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J. Immunol.* 154: 3806-13 (1995)
- Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade : a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 76: 1-10 (2001)
- Tada Y, O-Wang J, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Okada S, Tokuhisa T, Sakiyama S, Tagawa M. A novel role for Fas ligand in facilitating antigen acquisition by dendritic cells. *J. Immunol.* 169: 2241-2245 (2002)
- Tagliaro F, De Battisti Z, Smith FP, Marigo M. Death from heroin overdose: findings from hair analysis. *Lancet* 351: 1923-1925 (1998)
- Taylor DA, Fleming WW. Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297: 11-18 (2001)
- Tegeder I, Grosch S, Schmidtko A, Haussler A, Schmidt H, Niederberger E, Scholich K, Geisslinger G. G protein-independent G(1) cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. *Cancer Res.* 63: 1846-1852 (2003)
- Tegeder I, Geisslinger G. Opioids as modulators of cell death and survival-Unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacological Reviews* 56: 351-369 (2004)
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-6 (1998)
- Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nature Immunol.* 4: 404-409 (2003)
- Tourneur L, Buzyn A, Chiocchia G. FADD adaptor in cancer. *Med. Immunol.* 4: 1-9 (2005)
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4 (1979)

- Ueda H. Locus-specific involvement of anti-opioid systems in morphine tolerance and dependence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1025: 376-382 (2004)
- Ulibarri I, García-Sevilla JA, Ugedo L. Modulation of brain α_2 -adrenoceptors and μ -opioid receptor densities during morphine dependence and spontaneous withdrawal in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 336: 530-537 (1987)
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91: 627-37 (1997)
- Veeranna GJ, Amin ND, Ahn NG, Jaffe H, Winters CA, Grant P, Pant HC. Mitogen-activated protein kinase (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. *J. Neurosci.* 18: 4008-4021 (1998)
- Veeranna GJ, Shetty KT, Takahashi M, Grant P, Pant HC. Cdk5 and MAPK are associated with complexes of cytoskeletal proteins in rat brain. *Mol. Brain Res.* 76: 229-236 (2000)
- Veinante P, Stoeckel M-E, Lasbennes F, Freund-Mercier M-J. c-Fos and peptide immunoreactivities in the central extended amygdala of morphine-dependent rats after naloxone-precipitated withdrawal. *Eur. J. Neurosci.* 18: 1295-1305 (2003)
- Ventayol P, Busquets X, García-Sevilla JA. Modulation of immunoreactive protein kinase C- α and β isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355: 491-500 (1997)
- Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23: 2838-2849 (2004)
- Wajant H. The Fas signalling pathway: more than a paradigm. *Science* 296: 1635-1636 (2002)
- Wang J, Charboneau R, Barke RA, Loh HH, Roy S. μ -Opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.* 169: 3630-3636 (2002)
- Wang Z-B, Liu Y-Q, Cui Y-F. Pathways to caspase activation. *Cell Biology International*. En prensa (2005)
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J. Immunol.* 148: 1274-1279 (1992)
- Whistler JL, Zastrow Von M. Dissociation of functional roles of dynamin in receptor-mediated endocytosis and mitogenic signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274: 24575-24578 (1999)
- Widnell KL, Russell DS, Nestler EJ. Regulation of expression of cAMP response element-binding protein in the locus coeruleus in vivo and in a locus coeruleus-like cell line in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 10947-10951 (1994)
- Widnell KL, Self DW, Lane SB, Russell DS, Vaidya VA, Miserendino MJ, Rubin CS, Duman RS, Nestler EJ. Regulation of CREB expression: In vivo evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276: 306-315 (1996)
- Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.* 81: 299-343 (2001)

- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 139: 1281-92 (1997)
- Wu WR, Zheng JW, Li N, Bai HQ, Zhang KR, Li Y. Immunosuppressive effects of dihydroetorphine, a potent narcotic analgesic, in dihydroetorphine-dependent mice. *Eur. J. Pharmacol.* 366: 61-69 (1999)
- Xiao Y, He JH, Gilbert RD, Zhang L. Cocaine induces apoptosis in fetal myocardial cells through a mitochondria-dependent pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 8-14 (2000)
- Xu J, He J, Castleberry AM, Balasubramanian S, Lau AG, Hall RA. Heterodimerization of α_{2A} - and β_1 -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 278: 10770-10777 (2003)
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-32 (1997)
- Yin DL, Ren XH, Zheng ZL, Pu L, Jiang LZ, Ma L, Pei G. Etorphine inhibits cell growth and induces apoptosis in SK-N-SH cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G proteins. *Neurosci. Res.* 29: 121-127 (1997)
- Yin D, Mufson RA, Wang R, Shi Y. Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature* 397: 218 (1999)
- Yin D, Tuthill D, Mufson RA, Shi Y. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J. Exp. Med.* 191: 1423-1428 (2000)
- Yu VC, Richards ML, Sadée W. A human neuroblastoma cell line expresses μ and δ opioid receptor sites. *J. Biol. Chem.* 261: 1065-1070 (1986)
- Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809 (2000)
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87: 619-28 (1996)
- Zhang J, Winoto A. A mouse Fas-associated protein with homology to the human Mort1/FADD protein is essential for Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 16: 2756-2763 (1996)
- Zhang J, Haddad GG, Xia Y. Delta-, but not mu- and kappa-, opioid receptor activation protects neocortical neurons from glutamate-induced excitotoxic injury. *Brain Res.* 885: 143-153 (2000)
- Zhang W-B, Zhang Z, Ni Y-X, Wu Y-L, Pei G. A novel function of $G\alpha$: mediation of extracellular signal-regulated kinase activation by opioid receptor in neural cells. *J. Neurochem.* 86: 1213-1222 (2003)
- Zhang J, Zhang D, Hua Z. FADD and its phosphorylation. *IUBMB Life* 56: 395-401 (2004)
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92: 57-70 (2001)
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-13 (1997)