



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SEDE SUR

Departamento de Farmacobiología

**Diferencias en tráfico vesicular y señalización del receptor  $\mu$ -opioide  
activado por morfina y fentanilo en células cebadas y posible participación  
del receptor TLR4**

Tesis que presenta

**Q.F.B. Frida Leticia Martínez Cuevas**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en  
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directoras de tesis

**Dra. Claudia González Espinosa  
Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo**

Este trabajo se realizó en los laboratorios 10 y 11 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría de la Dra. Claudia González Espinosa y la Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo. Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de maestría número 636016 y de los proyectos CB239192 y CONACYT FC1122.

*A mis padres Ulises y Leticia*

*Por enseñarme a superarme cada día más y ser mí apoyo incondicional en la vida*

*A mi hermana Tonatzin*

*Por enseñarme la paciencia y que la felicidad está en las cosas más*

*sencillas de la vida*

*A Herman*

*Por escucharme y apoyarme*

## **Agradecimientos**

A mis tutoras: la Dra. Claudia González Espinoza y la Dra. Silvia L. Cruz Martín del Campo por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por todo el apoyo, conocimiento y consejos que me brindaron. Por exigirme más siempre muchas gracias.

A mi comité sinodal: la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, la Dra. Mónica Lamas Gregori y la Dra. Iris Madera Salcedo. por todo el tiempo dedicado, por el apoyo en este trabajo y por todas las preguntas que hicieron complementar mi trabajo.

A mis padres: Ulises y Leticia por ser mi apoyo incondicional en la vida, por impulsarme a superarme, por dejarme uno de los regalos más grandes de la vida, la educación. Infinitas gracias. A mi hermana Tonatzin: por enseñarme la paciencia y que la felicidad está en las cosas más sencillas de la vida, por ser mi motor. A Herman por ser mi fan número uno, por escucharme, apoyarme y compartir conmigo los momentos de estrés, frustración y alegría.

A mi familia: mis abuelitos Epifanio y Estela por siempre estar orgullosos de lo que he logrado y por amarme tanto. A mis tíos Noé, Eurípides, Rosalba por apoyarme, animarme y enorgullecerse de mí. A mis primas Rosalba y Arminda por escucharme, apoyarme, animarme en las etapas más duras de mi formación.

A la M.C, Araceli Hernández y a el M.C. Alfredo Ibarra por ayudarme con todas las técnicas de mi tesis y apoyarme en los experimentos. Al Dr. René Garduño por el apoyo técnico para mejorar los protocolos de mis inmufluorescencias, la adquisición de imágenes en el microscopio confocal, el análisis de las mismas y por enseñarme a usar el microscopio confocal.

A mis compañeros del laboratorio 10 y 11: César y Zyanya por el apoyo incondicional y sugerencias en el contenido de este trabajo. A Iker, Rodolfo, Deysi, Dulce, Monse, Ana Karén, Nancy, Mariam, Itzel, Daniel, Magnolia y Pablo, por escucharme y compartir el estrés y los buenos momentos.

A Alejandro por convertirse en un gran amigo durante estos dos años. A Iván por vivir conmigo estos dos años. A mis compañeros de generación: Daniel, Iker, Eduardo, Dianita, Hernan, Saúl, Grecia, Adri, Cristina y Erik por ser la mejor generación que pude tener.

## Índice general

Abreviaturas .....	I
Índice de figuras .....	IV
Índice de tablas .....	VI
Resumen .....	VII
Abstract .....	VIII
1 Introducción .....	1
1.1 Opioides .....	1
1.1.1 Morfina .....	1
1.1.2 Fentanilo .....	2
1.1.3 Agonismo sesgado de la morfina y el fentanilo .....	3
1.1.4 Efectos .....	4
1.2 Receptores opioides .....	5
1.2.1 Receptor $\mu$ .....	7
1.2.2 Señalización y tráfico vesicular del receptor $\mu$ .....	7
1.2.2.1 $\beta$ -arrestina .....	11
1.2.2.2 Proteínas Rabs .....	12
1.2.2.3 Nube perinuclear .....	14
1.3 Sistema inmune innato .....	15
1.3.1 Células cebadas .....	16
1.3.2 Receptor toll-like 4 .....	18
1.4 Efectos de la morfina y el fentanilo en células cebadas .....	21
2 Planteamiento del problema .....	24
3 Hipótesis .....	24
4 Objetivos .....	24
4.1 Objetivo general .....	24
4.2 Objetivos particulares .....	25
5 Materiales y métodos .....	26
5.1 Animales .....	26

5.2 Fármacos y anticuerpos .....	26
5.3 Obtención de células cebadas .....	26
5.4 Estímulos con morfina, fentanilo y naloxona .....	27
5.5 Inmunofluorescencia .....	28
5.6 Microscopía confocal .....	29
5.7 Análisis de las imágenes .....	30
5.7.1 Porcentaje de área.....	30
5.7.2 Colocalización .....	30
5.7.3 Perfil de intensidad de fluorescencia .....	30
5.8 Diseño experimental .....	32
5.8.1 Evaluación del tráfico vesicular del receptor $\mu$ activado por morfina fentanilo en BMMCs.....	32
5.8.2 Determinación de la participación del receptor TLR4 en la internalización y tráfico del receptor $\mu$ en BMMCs estimuladas con morfina y fentanilo.....	33
6 Resultados .....	34
6.1 Tráfico vesicular del receptor $\mu$ activado por morfina y fentanilo en BMMCs.....	34
6.1.1 En condiciones basales el receptor $\mu$ se encuentra internalizado y colocalizando con la $\beta$ -arr2 activa en BMMCs .....	34
6.1.2 La morfina y el fentanilo aumentan la colocalización del $\mu$ con la $\beta$ -arr2 activa en BMMCs .....	36
6.1.3 La morfina y el fentanilo aumentan el porcentaje de área de la $\beta$ -arr2 activa en BMMCs .....	42
6.1.4 La morfina disminuye la colocalización del receptor $\mu$ en los endosomas tardíos .....	44
6.1.5 El fentanilo induce el tráfico vesicular del receptor $\mu$ por endosomas de reciclamiento tardío .....	47
6.1.6 La morfina y el fentanilo inducen el tráfico vesicular del receptor $\mu$ por la nube perinuclear .....	49
6.2 Determinación de la participación del receptor TLR4 en la internalización y tráfico del receptor $\mu$ en BMMCs estimuladas con morfina y con fentanilo .....	54
7 Discusión .....	57

8 Conclusiones .....	64
9 Perspectivas .....	65
10 Referencias bibliográfica .....	66

## Abreviaturas

AA	Aminoácidos
AC	Adenilato ciclasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
AP2	Proteína adipocitaria 2
$\beta$ -arr2	$\beta$ -arrestina2
BMMCs	Células cebadas derivadas de médula ósea
BSA	Albúmina de suero bovino
CC	Células cebadas
CD14	Grupo de diferenciación 14
CG	Complejo de Golgi
C-Kit	Receptor c-Kit
CV	Vesículas cubiertas de clatrina
CREB	Elemento modulador de respuesta a AMPc
DAMGO	[D-Ala <sup>2</sup> , N-MePhe <sup>4</sup> , Gly-ol]-encefalina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DOP	Receptor opioide $\delta$
DyN	Dinorfina
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
ERL	Endosomas de reciclamiento lento
ESID	Módulo de iluminación y detección conmutable electrónicamente
ETD	Endosomas tardíos
Fc $\gamma$ RI	Receptor de alta afinidad a la IgE
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GRK	Cinasa de receptores acoplados a proteínas G

GTPasas	Fosfatasas de trifosfato de adenosima
IKK	Complejo $\alpha/\beta$ de cinasas del inhibidor de NFKappaB
IL-1	Interleucina 1
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IUPHAR	The International Union of Pharmacology
JNK	Cinasa del amino terminal de c-Jun
KOP	Receptor opioide $\kappa$
LBP	Proteína de unión al lipopolisacárido
Lis	Lisomas
LRR	Dominio rico en repeticiones de leucina
LPS	Lipopolisacárido
MAP	Proteína asociada a microtúbulos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MD2	Antígeno linfocítico 96
MOP	Receptor opioide $\mu$
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
MyD88	Proteína de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIDA	Instituto Nacional sobre el abuso de drogas
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer de fosfatos y salina
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLD-2	Fosfolipasa D 2
PM	Membrana plasmática

PPR	Receptor de reconocimiento de patrones
Rab	GTPasas de direccionamiento
RE	Retículo endoplásmico
RNF26	Proteína del dedo anular 26
rpm	Revoluciones por minuto
SI	Sistema inmune
SGTM1	Secuestrosoma 1
TRAM	Proteína 2 de la membrana asociada a la cadena de translocación
TIRAP	Dominio TIR que contiene a la proteína adaptadora
TGN	Compartimento trans-Golgi
TLR	Receptor toll-like
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF6	Factor 6 asociado al factor de necrosis tumoral
TRIF	Adaptador de los receptores toll/interleucina 1
USP15	Ubiquitina hidrolasa 15 del carboxilo terminal

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la morfina .....	2
Figura 2. Estructura del fentanilo.....	2
Figura 3. Representación estructural del receptor $\mu$ .....	7
Figura 4. Vía canónica de señalización del receptor $\mu$ .....	8
Figura 5. Proceso de unión de la $\beta$ -arr2 al receptor $\mu$ .....	9
Figura 6. Señalización del receptor $\mu$ dependiente e independiente de la proteína.....	10
Figura 7. Internalización de los GPCRs.....	11
Figura 8. Modelo de las formas activa e inactiva de la $\beta$ -arr2 .....	12
Figura 9. Localización de algunas Rabs.....	13
Figura 10. Estructura de la nube perinuclear.....	14
Figura 11. Imagen representativa de una célula cebada.....	18
Figura 12. Señalización del TLR4.....	20
Figura 13. Receptor TLR4 con la morfina acoplada al sitio de unión <i>in-silico</i> ....	21
Figura 14. Posible mecanismo de inhibición de la secreción de citocinas por acción de los opioides .....	23
Figura 15. Ejemplo de las mediciones del perfil de fluorescencia .....	31
Figura 16. Localización del receptor $\mu$ y la $\beta$ -arr2 activa en células cebadas no estimuladas .....	35
Figura 17. Imágenes representativas de los cortes de las células marcando al receptor $\mu$ y a la $\beta$ -arr2 activa a los diferentes tiempos de estimulación con morfina.....	37
Figura 18. Imágenes representativas de los cortes de las células marcando al receptor $\mu$ y a la $\beta$ -arr2 activa a los diferentes tiempos de estimulación con fentanilo .....	38
Figura 19. Coeficientes de Manders del receptor $\mu$ y la $\beta$ -arr2 en respuesta a los estímulos de morfina y fentanilo en BMMCs .....	39
Figura 20. Perfiles de intensidad de fluorescencia del receptor $\mu$ y la $\beta$ -arr2 en cortes medios de las células estimuladas con morfina los estímulos con morfina.....	40
Figura 21. Perfiles de intensidad de fluorescencia del receptor $\mu$ y la $\beta$ -arr2 en	

cortes medios de las células estimuladas con morfina los estímulos con fentanilo .....	41
Figura 22. Porcentajes de área celular ocupados por el receptor $\mu$ y la con los estímulos de morfina y $\beta$ -arr2 activa en respuesta a los tiempos de estimulación con la morfina y el fentanilo en BMMCs .....	43
Figura 23. Imágenes representativas de los cortes medios de las células estimuladas con morfina o fentanilo con marcas del receptor $\mu$ y Rab 7.....	45
Figura 24. Coeficiente de Manders de la colocalización entre el receptor $\mu$ y Rab 7 en BMMCs .....	46
Figura 25. Imágenes representativas de los cortes medios de las células estimuladas con morfina o fentanilo con marcas del receptor $\mu$ y Rab 11 .....	47
Figura 26. Coeficiente de Manders de la colocalización entre el receptor $\mu$ y Rab 11 .....	48
Figura 27. Imágenes representativas de la ubicación de la nube perinuclear en BMMCs .....	49
Figura 28. Imágenes representativas de la ubicación del receptor $\mu$ en la nube perinuclear en BMMCs estimuladas con morfina o fentanilo .....	50
Figura 29. Coeficiente de Manders de la colocalización entre el receptor $\mu$ y RNF26 en respuesta a los estímulos de morfina y fentanilo .....	51
Figura 30. Coeficiente de Manders de las colocalizaciones del receptor $\mu$ con todas las proteínas analizadas con los estímulos de morfina y fentanilo por 5 min .....	52
Figura 31. Coeficiente de Manders de las colocalizaciones del receptor $\mu$ con todas las proteínas analizadas con los estímulos de morfina y fentanilo por 2.5 min .....	53
Figura 32. Imágenes representativas de BMMCs estimuladas con naloxona por 5 min y posteriormente con morfina o fentanilo por 5 min más .....	55
Figura 33. Coeficiente de Manders de la colocalización entre el receptor $\mu$ y $\beta$ -arr2 con estimulación de naloxona previo a los estímulos con morfina y fentanilo.....	56
Figura 34. Tráfico del receptor $\mu$ en BMMCs generado por morfina y fentanilo en BMMCS .....	63

## Índice de tablas

Tabla 1. Características de la morfina y el fentanilo .....	3
Tabla 2. Genes de los 3 principales subtipos de receptores opioides .....	6
Tabla 3. Localización de algunas proteínas Rabs .....	13
Tabla 4. Efectos de los opioides en células del sistema inmune .....	16
Tabla 5. Combinaciones de anticuerpos .....	29

## Resumen

Los opioides han sido ampliamente estudiados por sus efectos en la inhibición del dolor. Su uso crónico está limitado por sus efectos secundarios, como son dependencia, adicción e inmunosupresión. Todas las células del sistema inmune, incluyendo a las células cebadas (CCs), presentan receptores a opioides. Además, se ha descrito que los opioides activan al receptor Toll-like 4 (TLR). La morfina y el fentanilo son agonistas sesgados; el primero hacia la vía de la proteína  $G_{i/o}$ , y el segundo, hacia la vía de la  $\beta$ -arrestina 2 ( $\beta$ -arr2). Sin embargo, se desconoce si estos agonistas opioides difieren en su tráfico vesicular y si el TLR4 participa en estos efectos. Las CCs no sólo son importantes en las alergias, también son de las primeras células en reaccionar a patógenos y desempeñan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio entre la inmunidad innata y adaptativa. En este trabajo se estudió el tráfico vesicular del receptor  $\mu$  activado por morfina y fentanilo en CCs derivadas de médula ósea (BMMCs). Nuestros resultados muestran que el receptor  $\mu$  se encuentra internalizado, interaccionando con la  $\beta$ -arr2 y en constante tráfico vesicular en condiciones basales. La morfina aumentó la interacción del receptor  $\mu$  opioide con  $\beta$ -arr2 y la cantidad del receptor en la nube perinuclear, pero disminuyó su presencia en endosomas tardíos. El fentanilo aumentó la interacción del receptor  $\mu$  opioide con  $\beta$ -arr2 a tiempos más cortos que la morfina, incrementó la localización del receptor  $\mu$  en la nube perinuclear y la cantidad del receptor en endosomas de reciclamiento lento. Finalmente, observamos que la naloxona inhibió la unión del receptor  $\mu$  opioide y la  $\beta$ -arr2, por lo que los efectos observados son atribuibles al receptor  $\mu$ .

## Abstract

Opioids have been widely studied for their effects on pain inhibition. Their chronic use is limited by their side effects, such as dependence, addiction and immunosuppression. All the immune cells, including mast cells (MCs), have opioid receptors. Besides, it has been described that opioids activate Toll-like receptor 4 (TLR4). Morphine and fentanyl are biased agonists; the former signaling through  $G_{i/o}$  proteins, and the latter via  $\beta$ -arrestin2 pathway. However, it is not known whether these opioid agonists differ in vesicular traffic or if TLR4 play a role in this effect. MCs are not only important in allergies, also, they are part of the first cells that react to pathogens and play an important role in maintaining an equilibrium between innate and adaptive immunity. In the present work, we studied the vesicular traffic of the  $\mu$  opioide receptor activated by morphine and fentanyl in bone marrow-derived mast cells (BMDCs). Our results show that this receptor is internalized, interacts with  $\beta$ -arr2, and undergoing vesicular traffic at baseline conditions. Morphine increased the interaction of  $\mu$  opioide receptors with  $\beta$ -arr2, the amount of  $\mu$  opioid receptors located at the perinuclear cloud, and decreased their presence in late endosomes. Fentanyl increased the interaction of  $\mu$  opioid receptors with  $\beta$ -arr2 at shorter times than morphine, increased the presence of  $\mu$  opioid receptors at the perinuclear cloud and in late recycling endosomes. Finally, we observed that naloxone inhibited the association of  $\mu$  opioid receptors with  $\beta$ -arr2, which implies that the observed effects are mediated by  $\mu$  receptors.

# 1 Introducción

## 1.1 Opioides

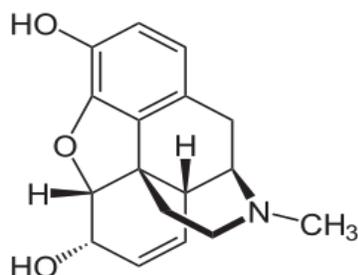
Los opioides son moléculas endógenas y exógenas que se unen a uno o más receptores específicos en el organismo. Esta definición es general ya que engloba a compuestos naturales y sintéticos con estructura o efectos similares a los de la morfina. Por otro lado, el término opiáceo se utiliza para nombrar a los alcaloides derivados del opio. El opio se extrae del exudado lechoso de las cápsulas inmaduras de la amapola *Papaver somniferum* (Williams *et al.*, 2013; Santella 2007). En clínica, los opioides se utilizan como tratamiento para el dolor agudo y crónico terminal. Fuera de la clínica se emplean como drogas de abuso (Vuong *et al.*, 2010).

### 1.1.1 Morfina

La morfina es el principal componente activo del opio. Fue extraída por primera vez por Friedrich Wilhelm Sertürner entre 1805 y 1816 quien le asignó el nombre de morfina en relación a Morfeo, el dios griego de los sueños (Busse, 2006).

La estructura de la morfina presenta un esqueleto de fenantreno (tres anillos de benceno), un anillo de furano, un anillo de piperidina con un grupo N-metilo en el carbono 17 y dos grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 6, lo que le da un peso molecular de 285.343 g/mol (Chrétien *et al.*, 1979) (figura 1). Este fármaco tiene un pKa de 7.9, es una base débil y casi no es soluble en lípidos a pH fisiológico (MacKenzie *et al.*, 2016).

La morfina es un agonista de los tres subtipos de receptores opioides: el receptor  $\mu$ , el  $\delta$  y el  $\kappa$ . La morfina presenta mayor afinidad por el receptor  $\mu$  con una constante de unión de 1 mM y tiene 10 veces menor afinidad por los otros receptores (MacKenzie *et al.*, 2016).

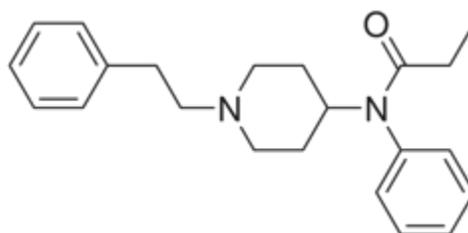


**Figura 1.** Estructura de la morfina

### 1.1.2 Fentanilo

El fentanilo es un opioide sintético de cincuenta a cien veces más potente que la morfina y pertenece a la familia de las fenilpiperidinas. En su estructura contiene un anillo de fenilo unido a una piperidina, seguido de un grupo fenil y una propanamida, teniendo un peso molecular de 336.479 g/mol (figura 2). El uso principal de este fármaco es en el tratamiento del dolor post-operatorio y como anestésico (Vallejo *et al.*, 2011; MacKenzie *et al.*, 2016).

El fentanilo es un agonista selectivo y altamente potente del receptor  $\mu$ , con una constante de unión de 0.4 mM para este receptor. Este fármaco presenta una pKa de 8.4 y es altamente soluble en lípidos (Vallejo *et al.*, 2011; Lötsch *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Estructura del fentanilo

Las principales características diferentes entre la morfina y el fentanilo se engloban en la tabla 1. Estos dos opioides presentan una característica diferente entre ellos que es de gran importancia para este trabajo el agonismo sesgado.

**Tabla 1. Características de la morfina y el fentanilo**

	Morfina	Fentanilo
Dosis equianalgésica	10 mg	0.1 mg
Selectividad	Agonista $\mu$ , $\kappa$ y $\delta$	Agonista $\mu$
Ki para el receptor $\mu$	1 mM	0.4 mM
Internalización del receptor	+	+++
Señalización preferencial	G <sub>i/o</sub>	$\beta$ -arrestina
pKa	7.9	8.4
Solubilidad en lípidos	Baja	Alta

### 1.1.3 Agonismo sesgado de morfina y fentanilo

Los opiáceos difieren en su capacidad de mediar el tráfico vesicular de los receptores, debido a que cada uno de ellos tiene una señalización preferencial por proteínas G o por  $\beta$ -arrestina 2 ( $\beta$ -arr2). A esta propiedad se le llama agonismo sesgado. Por ejemplo, la morfina es capaz de señalizar por la vía de la proteína G y tiene poca capacidad de provocar endocitosis del receptor  $\mu$  por  $\beta$ -arr2. Por otro lado, el fentanilo tiene mayor capacidad para inducir la endocitosis del receptor  $\mu$  y puede activar la señalización de la vía de ERK1/2 dependiente de  $\beta$ -arr2 (Willians *et al* 2013., Luttrell *et al.*, 2010).

El agonismo sesgado depende de diferentes factores como: la estabilidad del receptor, el ligando y la proteína encargada de la señalización así como del tipo de célula, la cantidad y el tiempo de exposición al ligando.

Algunos estudios muestran que la capacidad para reclutar a la  $\beta$ -arr2 depende del grado de fosforilación del receptor  $\mu$ . Agonistas altamente eficaces como el fentanilo, la etorfina, la metadona, y el DAMGO promueven la fosforilación del receptor  $\mu$  y el reclutamiento de la  $\beta$ -arr2. Agonistas como la morfina, la oxicodona y la oximorfina producen menor fosforilación del receptor  $\mu$  y menor acoplamiento de la  $\beta$ -arr2 al receptor (Raehal *et al.*, 2011). Así mismo, la señalización intracelular producida por morfina y fentanilo es diferente; por ejemplo, la activación de ERK1/2 mediada por morfina es dependiente de la proteína cinasa C

(PKC) y actúa en el citosol, mientras que la activación de ERK1/2 por fentanilo es dependiente de  $\beta$ -arr2 y produce la translocación de la proteína al núcleo (Zheng et al., 2008; Raehal et al., 2011; Willians *et al* 2013).

El tráfico intracelular y el agonismo sesgado dependen no solamente del ligando que se une al receptor, sino también de la célula y la maquinaria de señalización. Se sabe que todas las células del SI presentan receptores a opioides y que pueden secretar opioides endógenos para regular la inflamación y el dolor (Liang *et al.*, 2016). Además, se ha observado que la morfina y el fentanilo en células del SI tienen efectos diferentes. Por ejemplo, en células T, la estimulación con fentanilo aumenta el RNAm de interleucina 4 (IL-4, que tiene efectos anti inflamatorios) y la estimulación con morfina disminuye los niveles del RNAm de esta interleucina (Börner *et al.*, 2013). Debido a la versatilidad de efectos de los opioides en el SI, no está bien esclarecido cómo es el tráfico vesicular de los receptores opioides en estas células.

#### 1.1.4 Efectos

Los principales efectos benéficos de los opioides en el sistema nervioso son: analgesia, euforia y supresión de la tos (Busse 2006; Cruz y Granados 2016). Estos fármacos suprimen la transmisión del dolor al unirse a sus receptores pre- y post-sinápticos en la médula espinal y en estructuras supraespinales como la corteza somatosensorial, tálamo, rafé dorsal, locus ceruleus (Vuong *et al.*, 2010).

Los efectos adversos de los opioides son el principal impedimento para su uso prolongado. Entre estos efectos se encuentran: la disminución de la motilidad gastrointestinal a la que no se desarrolla tolerancia, la depresión respiratoria, el vómito, las náuseas, el desarrollo de tolerancia a sus efectos analgésicos (disminución de la respuesta generada por una dosis, que induce a aumentarla) y la dependencia física (necesidad de ingerir un fármaco para evitar las manifestaciones de un síndrome de abstinencia) (Sobczak *et al.*, 2014., Hutchinson *et al.*, 2011., Nestler *et al.*, 1994). Además, los opioides pueden disminuir la actividad del sistema inmune (SI), dejando al huésped susceptible a

enfermedades, sin embargo, las acciones ejercidas por los opioides sobre el SI no están bien esclarecidas (Wang *et al.*, 2008).

## 1.2 Receptores opioides

Los opioides ejercen sus efectos al unirse a los tres subtipos principales de receptores a opioides: el receptor  $\mu$ , el  $\delta$  y el  $\kappa$  (Martin 1984), *The International Union of Pharmacology* (IUPHAR) determinó las siglas MOP, DOP y KOP respectivamente para designar estos receptores (Cox *et al.*, 2015).

Los receptores a opioides se expresan en el cerebro, órganos endocrinos, corteza suprarrenal, gónadas, tracto gastrointestinal, fibras nociceptivas periféricas y en todas las células del sistema inmune (Vuong *et al.*, 2010). Se encuentran acoplados a proteínas G intercambiadoras de nucleótidos de guanina, por lo que pertenecen a la familia conocida como GPCRs (G protein-coupled receptors) clase A. Activan a proteínas G de la familia de  $G_{i/o}$  y tienen 7 dominios transmembranales de hélices  $\alpha$ . Los GPCRs se encuentran altamente conservados en especies de mamíferos y son fundamentales en múltiples procesos fisiológicos ya que existen más de 800 tipos en el humano y son blanco de aproximadamente el 30% de los fármacos (Wacker *et al.*, 2017; Fredriksson *et al.*, 2013; Rask *et al.*, 2014).

Los receptores a opioides presentan una similitud en la secuencia de aminoácidos (aa) del 55 al 58%, sin embargo, el número de aa de cada uno es diferente, en la tabla 2 se observan los genes que codifican para los 3 subtipos de receptores opioides.

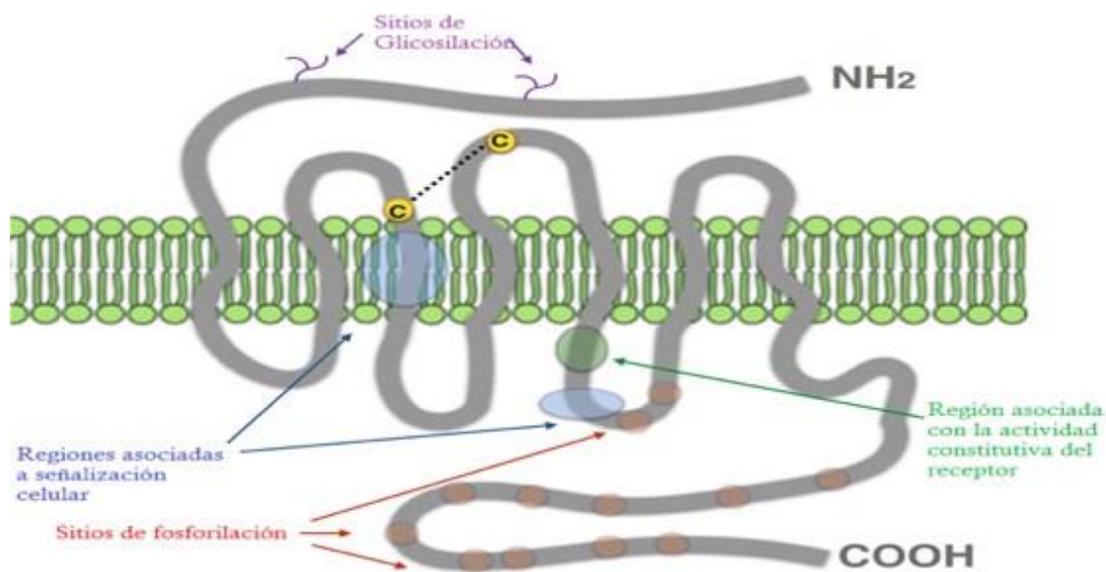
Tabla 2. Genes de los tres principales subtipos de receptores opioides

	Receptor $\mu$	Receptor $\delta$	Receptor $\kappa$
<b>Nombre del Gen</b>	<i>OPRM1</i>	<i>OPRD1</i>	<i>OPRK1</i>
<b>Número de exones</b>	4	3	5
<b>Número de intrones</b>	4	3	5
<b>Variantes de emplame</b>	23	3	6
<b>Número de aminoácidos de los transcriptos</b>	De 300 a 480 aa	De 272 a 324 aa	De 291 a 380 aa

Las variaciones en los aa de estos receptores se presentan en los sitios de unión a los ligandos y los sitios de fosforilación intracelular que sufren estos receptores son diferentes (Shang *et al.*, 2015; Darcq *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2015; LaForge *et al.*, 2015; Benyhe *et al.*, 2014; Cox *et al.*, 2015). Los receptores opioides son estereoselectivos, ya que sólo reconocen ligandos levógiros y no dextrógiros (Jimenez *et al.*, 1990). Estos receptores también forman homodímeros o heterodímeros (Koyyalagunta 2007). Se ha demostrado que el receptor  $\mu$  es el principal involucrado en los efectos terapéuticos y adictivos de los opioides (Matthes *et al.*, 1996).

### 1.2.1 Receptor $\mu$

El receptor  $\mu$  contiene sitios de glicosilación extracelulares y sitios de fosforilación intracelulares. Además, tiene dos cisteínas altamente conservadas que forman un puente disulfuro, el cual confiere estabilidad a la molécula (figura 3) (Raynor et al., 1994; Chen et al., 1993; Cruz y Granados 2015).

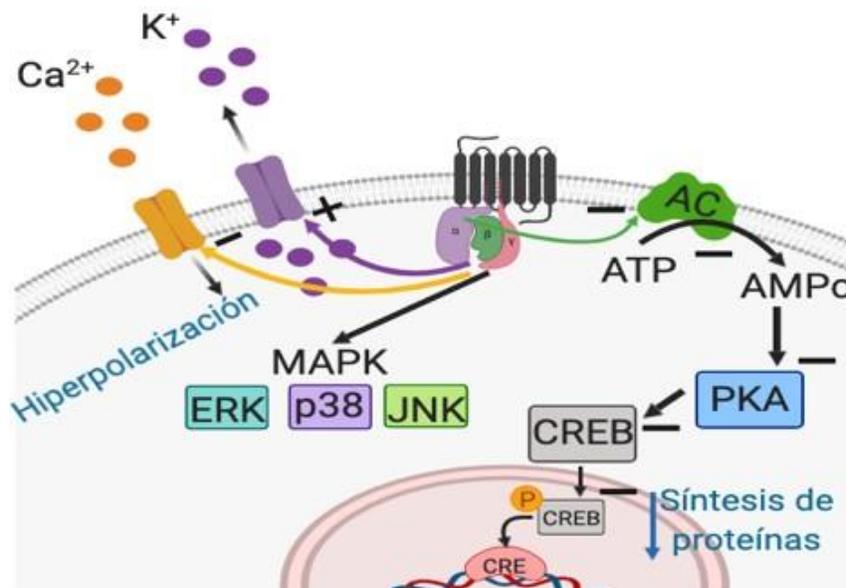


**Figura 3. Representación estructural del receptor  $\mu$ .** se observa al receptor con sus sitios de glicosilación extracelular, las regiones asociadas a señalización, en azul, y los sitios de fosforilación intracelular, en rojo. Adaptado de Cruz y Granados 2015).

### 1.2.2 Señalización y tráfico vesicular del Receptor $\mu$

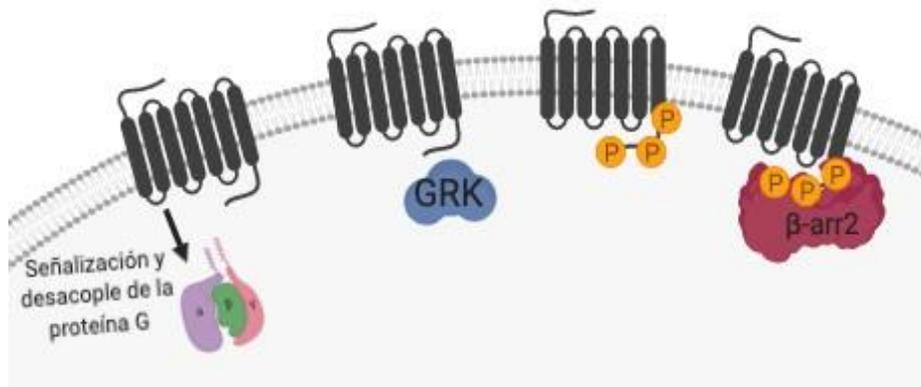
Cuando estos receptores se activan (figura 4) se da un cambio conformacional que activa a la proteína  $G_{i/o}$  la cual se disocia en la subunidad  $\alpha$  y el complejo  $\beta\gamma$  (Koehl et al., 2018; Kolinski et al., 2009). La subunidad  $\alpha$  inhibe a la enzima adenilato ciclasa (AC), lo cual reduce la producción de AMPc y la actividad de la proteína cinasa A (PKA). Esto produce una disminución de la fosforilación del factor de transcripción CREB y, por lo tanto, disminuye la expresión de algunos genes. Por otra parte, el complejo conformado por las subunidades  $\beta\gamma$  incrementa la conductancia de los canales de rectificación entrante de  $K^+$  y reduce la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  lo que lleva a una hiperpolarización celular (Palczewski et al.,

2000; Proft y Weiss 2015). Varias investigaciones señalan que la subunidad  $\beta\gamma$  estimula las cascadas de cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Estas vías comprenden las cinasas reguladas por señal extracelular (ERK), las cinasas N-terminal Jun (JNK) y las cinasas p38 (Belcheva y Coscia 2002; Gilman 1887; Brunton *et al.*, 2012).



**Figura 4. Vía canónica de señalización del receptor  $\mu$ .** Cuando el ligando activa al receptor, la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G_{i/o}$  inhibe a la enzima AC y la formación de AMPc, que resulta en una disminución de la fosforilación de CREB y con ello de la síntesis de proteínas. Por otro lado, el complejo de las subunidades  $\beta\gamma$  activa a los canales de  $K^+$  e inhibe a los de  $Ca^{2+}$ . Esta subunidad también estimula cascadas de señalización de las MAPK.

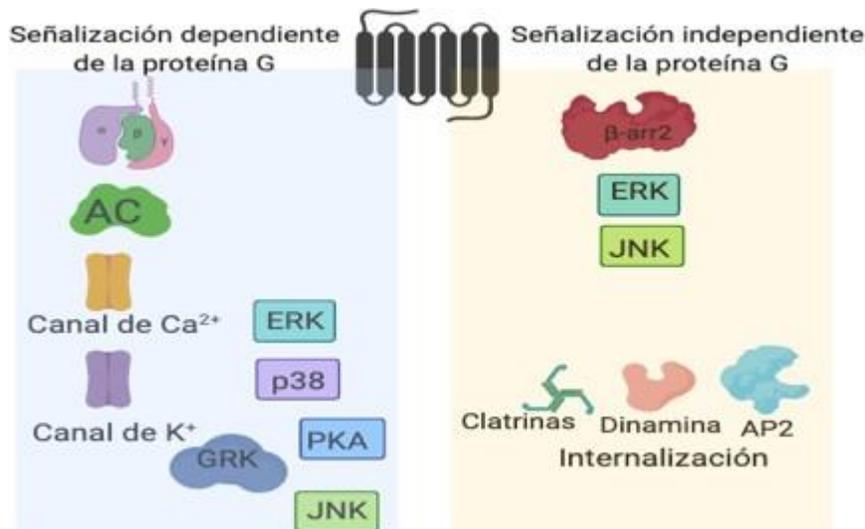
Una vez que los GPCRs se activan y se desacopla de la proteína  $G_{i/o}$ , la proteína cinasa de receptores acoplados a proteínas G (GRK) fosforila residuos de treonina o serina en el extremo carboxilo terminal y en la tercera asa citosólica del receptor que se exponen cuando la proteína  $G_{i/o}$  no está. Para el receptor  $\mu$  se sabe que actúan las GRK2 y la GRK3 (figura 5) (Zhang *et al.*, 1998; Kovoov *et al.*, 1998; Lowe *et al.*, 2015). Esta fosforilación evita la unión de la proteína G al receptor, pero facilita la de la proteína  $\beta$ -arrestina 2 ( $\beta$ -arr2) y con ello inicia un proceso de internalización del receptor con ayuda de otras proteínas.



**Figura 5. Proceso de unión de la  $\beta$ -arr2 al receptor  $\mu$ .** Cuando la proteína  $G_{i/o}$  señala y se desacopla del receptor, se exponen los sitios de fosforilación del receptor  $\mu$ . La proteína GRK fosforila estos sitios para que la  $\beta$ -arr2 se una al receptor.

El receptor  $\mu$  unido a  $\beta$ -arr2 se desensibiliza del ligando y se internaliza. Existen vías de señalización no dependientes de proteínas G, que pueden seguir operando (Luttrell *et al.*, 2010; Willians *et al.*, 2013). Las arrestinas sirven como andamios de reclutamiento de cinasas activadas por mitógeno (MAPK) como ERK1/2 y JNK3, que generan una cascada de señalización dependiente de  $\beta$ -arr2. Esta señalización tiene un comienzo lento, de aproximadamente una hora, y duración larga (Luttrell *et al.*, 2010).

El receptor  $\mu$  presenta varias vías de señalización (figura 6) las cuales dependen del ligando y del tipo de célula.

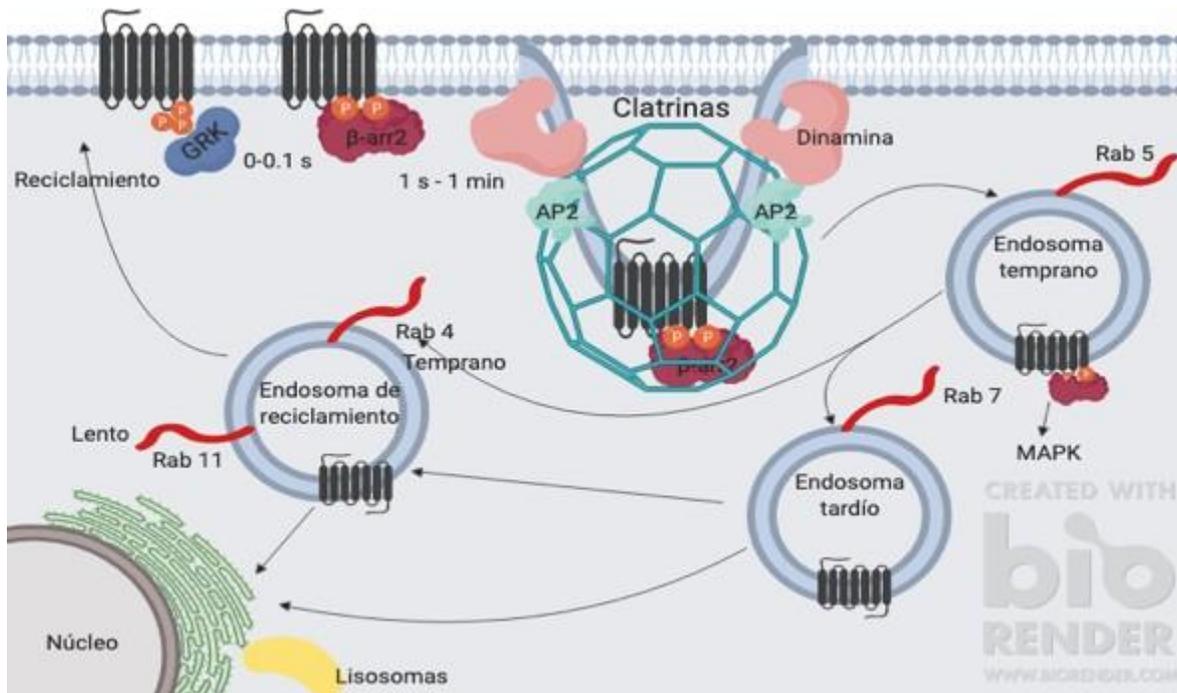


**Figura 6. Señalización del receptor  $\mu$  dependiente e independiente de la proteína G:** El receptor  $\mu$  tiene varias vías de señalización. La dependiente de la proteína G, que implica la inhibición de la AC y de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , el aumento en la conductancia de los canales de  $\text{K}^+$  y la activación de GRK y de MAPKs. La independiente de la proteína G incluye la activación de la  $\beta$ -arr2 y MAPKs y el reclutamiento de clatrin, dinamina y AP2 para la internalización del receptor.

La internalización de los GPCRs es un mecanismo de respuesta celular para regular su señalización. En un principio, se pensó que este efecto era solamente un mecanismo de terminación de la actividad del receptor, sin embargo, como ya mencionamos anteriormente, se ha demostrado que una vez internalizado el receptor puede señalizar (Bahoutha et al., 2017; Hanyaloglu et al., 2008). El proceso de internalización del receptor comienza cuando la  $\beta$ -arr2 se une al receptor este proceso ocurre muy rápidamente (0-1 s). La  $\beta$ -arr2 recluta entonces a la proteína AP2 y a clatrina para endocitar al receptor en vesículas (figura 7).

Los GPCRs internalizados pueden seguir diferentes rutas: a) desfosforilación y reciclaje a la membrana; b) transporte a lisosomas para su degradación; o c) retención en diferentes tipos de endosomas (Hanyaloglu et al., 2008; Rajagopal et al., 2018). Una vez endocitado, el receptor puede pasar por distintos compartimentos subcelulares, como endosomas tempranos, endosomas de reciclamiento temprano, la red trans-Golgi, endosomas de reciclamiento lento y finalmente, puede llegar a endolisosomas para degradarse. Los endosomas están recubiertos por diferentes proteínas, entre ellas, las proteínas de la familia Rab que son específicas para cada estadio de los endosomas y direccionan a las vesículas

a su membrana blanco (Calebio et al., 2010). Los endosomas pueden permanecer relativamente inmóviles en la nube perinuclear, el retículo endoplásmico, y la red trans-Golgi (RE) (Jongsma et al. 2016).

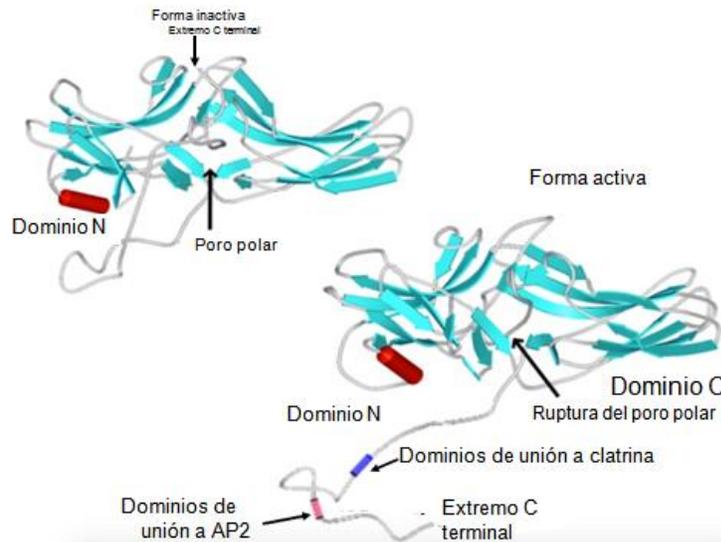


**Figura 7. Internalización de GPCRs.** El proceso comienza a los pocos segundos de activación del receptor, con la disociación de las subunidades de la proteína  $G_{i/o}$  y la exposición de los sitios de fosforilación. La proteína GRK fosforila (P) al receptor para que la  $\beta$ -arr2 se acople a este y con la ayuda de clatrin, AP2 y dinaminas endocitarlo. El receptor internalizado puede encontrarse en diferentes tipos de endosomas a los cuales se encuentran ancladas proteínas Rab que median el tráfico vesicular y sirven como marcadores.

### 1.2.2.1 $\beta$ -arrestina

Se han identificado 4 isoformas de la proteína arrestina, dos de las cuales, la arrestina-1 y la arrestina-4 se encuentran en células de los ojos. Las arrestinas-2 y 3 mejor conocidas como  $\beta$ -arrestina1 ( $\beta$ -arr1) y  $\beta$ -arrestina2 ( $\beta$ -arr2), respectivamente y se encuentran distribuidas en diversas células (Peterson & Luttrell 2017; Hilger et al., 2018). Los receptores a opioides están modulados principalmente por la  $\beta$ -arr2 (Bohn et al., 1999; Raehal et al., 2005). En reposo, la  $\beta$ -arr2 se encuentra totalmente compactada, por lo que las regiones terminales amino y carboxilo están poco

accesibles. Cuando la proteína se activa, sufre un cambio conformacional que lleva a la ruptura del núcleo polar, la exposición del extremo carboxilo terminal y el reordenamiento de las asas de la molécula para que el extremo NH<sub>2</sub> se acople al receptor en los sitios fosforilados (figura 8) (Scheerer et al., 2017; Hilger et al., 2018).

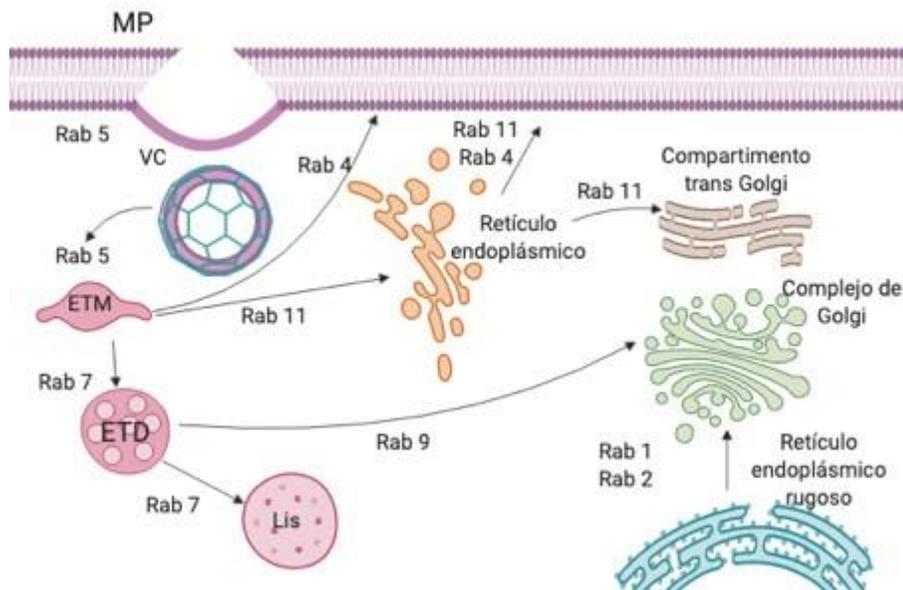


**Figura 8. Modelo de las**

**formas activa e inactiva de la β-arr.** La forma inactiva de la β-arr mantiene al extremo carboxilo terminal en el polo polar y una vez activa, hay un cambio conformacional que lleva a la ruptura del polo y la exposición de este extremo. Modificada de Lefkowitz et al., 2006).

### 1.2.2.3 Proteínas Rabs

Las proteínas Rab son GTPasas monoméricas que se encuentran en las membranas y ayudan a mediar el tráfico vesicular de una amplia variedad de proteínas, permitiendo la conectividad de toda la red vesicular (figura 9) (Alberts *et al.*, 2007). Las Rab son una superfamilia de aproximadamente 60 GTPasas (Lee et al., 2009). En la tabla 3 se muestra la localización de algunas Rabs. (Seachrist & Ferguson 2003).



**Figura 9. Localización de algunas Rabs.** Se observa en flechas el posible destino de los GPCRs al ser internalizados, desde la membrana plasmática (MP) en vesículas cubiertas por clatrina (VC), que se convierten en endosomas tempranos (ETM) marcadas con Rab 5, los cuales pueden retornar a la membrana en endosomas con Rab 4. Los ETM pueden pasar a ser endosomas tardíos (ETD) marcados con Rab 7, y separarse a lisosomas (Lis) o a la zona de reciclamiento perinuclear en el complejo de Golgi y al compartimento trans Golgi. Los ETD marcados con Rab 11 pueden retenerse en el retículo endoplásmico (RE) o retornar a la membrana.

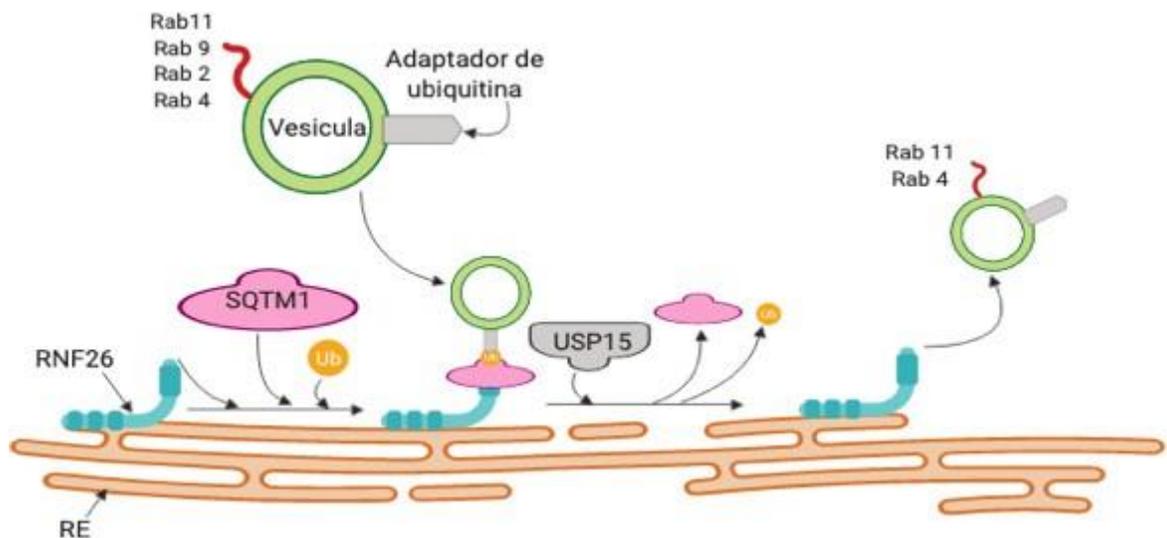
Tabla 3: Localización de algunas proteínas Rabs

Rabs	Localización
Rab 1	Endosomas del RE rugoso al complejo de Golgi
Rab 2	Endosomas del RE rugoso al complejo de Golgi
Rab 4	Endosomas de reciclamiento temprano
Rab 5	Endosomas tempranos
Rab 7	Endosomas tardíos a lisosomas
Rab 9	Endosomas tardíos al complejo de Golgi
Rab 11	Endosomas de reciclamiento lento al compartimento de Golgi, nube perinuclear y membrana plasmática

### 1.2.2.3 Nube perinuclear

El sistema endosomal es una red de vesículas y organelos encargados de modificar, empacar, seleccionar y transportar a las proteínas que la célula necesita. Este sistema es clave para regular todos los procesos celulares. Está compuesto por una compleja red membranosa de vesículas en la que cada vesícula puede moverse de manera autónoma en las células. Dentro de este sistema, el RE es un importante organizador espacio temporal de la red endosomal.

Las vesículas ancladas en el RE y alrededor del centro organizador de microtúbulos (MTOC, por sus siglas en inglés), forman una agrupación relativamente inmóvil de cisternas, a la que se le ha dado el nombre de "nube perinuclear" (figura 10). Esta nube controla la señalización de proteínas localizadas en endosomas, determinando cuáles siguen su señalización y cuáles son degradadas. Este mecanismo sirve para conservar la regulación de los estímulos extracelulares hacia el espacio intracelular (Neefjes *et al.*, 2017; Dellibovi *et al.*, 2016).



**Figura 10. Estructura de la nube perinuclear:** La proteína RNF26 con ayuda de SQSTM1 ancla los dominios de unión de ubiquitina de las vesículas en el retículo endoplasmático, cuando las proteínas dentro de estos endosomas son requeridas se liberan mediante una desubiquitinación con la ayuda de la enzima USP15.

La proteína RNF26 es una ubiquitina ligasa tipo E3 que mantiene a los endosomas unidos al RE con ayuda de una proteína de unión a ubiquitina p62/secuestosoma 1 (SGTM1). La SGTM1 se encarga de atraer dominios de unión a ubiquitina (UBD) que sirven como adaptadores vesiculares al RE. La liberación de las vesículas de la nube perinuclear se da por una desubiquitinasa llamada USP15 (Jongsma et al. 2016).

### **1.3 Sistema inmune innato**

La inmunidad innata es un sistema de defensa altamente conservado en todos los niveles de la escala filogenética. Responde a través de la activación de receptores localizados en células especializadas como macrófagos, neutrófilos, microglía, basófilos y células cebadas. Estas células secretan citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1 o IL-6, que ayudan a la migración de leucocitos al sitio de inflamación y a la activación de la respuesta inmune adaptativa (Medzhitov *et al.*, 1997; Iwasaki y Medzhitov 2004).

Las tres principales funciones de la respuesta inmune innata son: 1) impedir la entrada, controlar y eliminar al agente patógeno; 2) eliminar células dañadas e iniciar la reparación tisular; y 3) estimular e influir en la respuesta inmune adaptativa (Abbas *et al.*, 2015).

Las células de la inmunidad innata cuentan con receptores de reconocimiento de patrones (PPR). Estos receptores detectan moléculas de patógenos extraños denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). A menudo, los PAMPs son componentes de la pared celular de los patógenos, por ejemplo, lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico y lipoproteínas (Medshitov 2007).

El SI innato incluye una amplia variedad de células entre ellas:

- 1) Las células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos, que se encargan de ingerir y destruir patógenos.
- 2) Las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, que se

encargan de capturar y mostrar antígenos en su membrana para estimular la diferenciación de linfocitos.

3) Las células liberadoras de mediadores inflamatorios: los basófilos, los eosinófilos y las células cebadas.

Se sabe que todas las células del SI presentan receptores a opioides y dependiendo el tipo de célula y el ligando será la respuesta que generen. En la tabla 4 se mencionan algunos efectos de los opioides en células del SI.

Tabla 4: Efectos de los opioides en células del SI.

<b>Célula o modelo experimental</b>	<b>Opioide</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia</b>
<b>Macrófagos</b>	Morfina	Disminución de la actividad fagocítica	Rojavin <i>et al.</i> , 1993.
<b>Células NK (asesina natural)</b>	Fentanilo y morfina	Supresión de la actividad celular	Carr <i>et al.</i> , 1994. Franchi <i>et al.</i> , 2007
<b>Cancer</b>	Morfina	Estimula la angiogénesis y progresión del cancer	Nguyen <i>et al.</i> , 2014.
<b>Linfocitos T</b>	Morfina	Reducen la actividad celular	Shen <i>et al.</i> , 2014.
<b>Linfocitos T</b>	Fentanilo	Aumenta el RNAm de la IL-4	Börner <i>et al.</i> , 2013
<b>Linfocitos T</b>	Morfina	Disminuye el RNAm de la IL-4	Börner <i>et al.</i> , 2013

### 1.3.1 Células cebadas

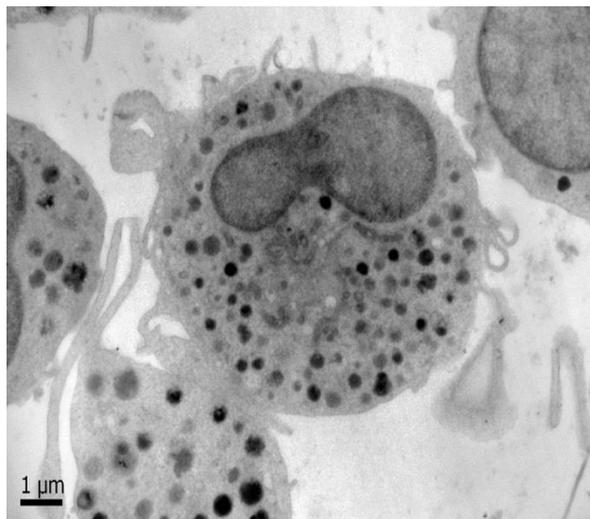
Las células cebadas (CC) pertenecen al linaje mieloide y se encuentran en las mucosas, la piel y los tejidos conectivos, por lo que actúan como centinelas en la interfase del exterior al interior del organismo. Este tipo celular es muy importante en las alergias, ya que desempeña un papel importante en las respuestas inmunes innatas y media las respuestas inmunes adaptativas. Entre sus efectos se encuentra la regulación de la vasodilatación, la angiogénesis, la anafilaxia, los

trastornos gastrointestinales, el crecimiento de tumores y enfermedades cardiovasculares por lo que una inhibición o deficiencia en estas células podría comprometer al hospedero.

Los progenitores de las CC se originan a partir de células pluripotentes de la médula ósea y del saco vitelino de donde migran hacia los tejidos. Las CC maduran en presencia del ligando c-kit, el factor de células madre (SFC por sus siglas en inglés), IL-3 y otros factores de crecimiento proporcionados por el ambiente del tejido (Krystel-Whittemore *et al.*, 2016; Gentek *et al.*, 2018).

Las CC se localizan en mucosas, tejidos epiteliales, tejidos vascularizados cerca de los vasos sanguíneos, nervios, en lugares de entrada del antígeno, células del músculo liso y debajo del epitelio en el tejido conectivo. En roedores, también se localizan en el peritoneo y en la cavidad torácica (Metcalf *et al.*, 2006).

Estas células contienen gránulos electrodensos en todo su citoplasma (50-200 por célula) como se muestra en la figura 11, en los cuales se almacenan mediadores inflamatorios como la histamina, la heparina, diversas citocinas y proteasas (Krystel-Whittemore *et al.*, 2016). La activación más común de las CC es por la vía de antígeno - inmunoglobulina E - receptor FcεRI (IgE-FcεRI) y da lugar a tres respuestas principales: 1) secreción del contenido preformado (desgranulación), 2) síntesis y secreción de mediadores lipídicos y 3) síntesis y secreción de citocinas (Abbas *et al.*, 2015; Subilano *et al.*, 2014).



**Figura 11. Imagen representativa de una célula cebada.** En la micrografía se observa a una célula cebada con el núcleo bilobulado. En negro oscuro se observan los gránulos preformados y la membrana plasmática con algunas prolongaciones. (Imagen del laboratorio 11 tomada por M.C. Alfredo Ibarra Sánchez.

Las CC no sólo expresan al receptor FcεRI, sino también a receptores de adenosina, quimiocinas, citocinas, diversos GPCRs y receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como los receptores tipo toll (TLR). Las CC son de las primeras células en responder a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y a PAMPs, debido a que secretan mediadores inflamatorios preformados en sus gránulos justo en el momento de la interacción con el patógeno, después comienzan la síntesis de *novo* (Burwen 1982).

Debido a la importancia que tienen en las alergias, la respuesta inmune innata y la mediación de la respuesta inmune adaptativa, así como los sitios donde se encuentran en el cuerpo, que son clave para defenderlo es importante comprender como los diferentes fármacos pueden afectar la respuesta de estas células.

### 1.3.1 Receptor toll-like 4

La familia de los receptores tipo toll (TLR) es altamente conservada y se expresa en diferentes tipos de células inmunes como células cebadas, macrófagos, neutrófilos y microglía.

Los TLR se dividen en dos grupos: el primero se expresa en la superficie celular y reconoce componentes de membranas bacterianas, lípidos, lipoproteínas y proteínas y comprende los receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6. En el segundo grupo se encuentran los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9. Estos reconocen a ácidos nucleicos bacterianos y se localizan intracelularmente en vesículas, retículo endoplasmático, endosomas y lisosomas (Kawai y Akira 2010)

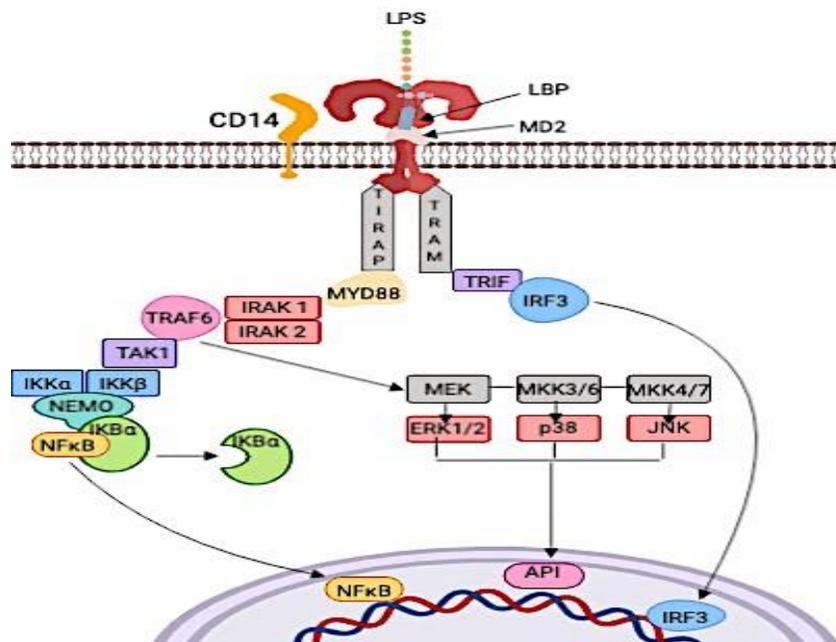
En el humano, se encuentran los subtipos TLR1 al TLR9 (Medzhitov *et al.*, 1997). Cada subtipo tiene una función, un reconocimiento de patrones moleculares y una respuesta celular diferente y específica. (Rock *et al.*, 1998). Los TLR son receptores transmembranales con un dominio citoplasmático llamado TIR el cual inicia la vía de señalización intracelular, un dominio extracelular rico en la secuencia leucina-arginina-arginina (LRR) que le da una estructura de semicírculo y es donde se acopla el ligando, y una región rica en cisteína cerca de la membrana (Rock *et al.*, 1998; Kawai y Akira 2010).

El receptor TLR4 tiene un papel clave tanto en la inmunidad innata y como en la adaptativa. Este receptor se activa por la unión de lipopolisacárido bacteriano (LPS) lo que produce la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), el interferón 1 (IFN- 1) y otras citocinas (Hoshino *et al.* 1999. Kawai y Akira 2010).

El mecanismo de señalización del TLR4 (figura 12) comienza cuando el LPS es reconocido por la proteína de unión a LPS (LBP por sus siglas en inglés). Este complejo se une a la proteína CD14 y forma el complejo LBP-LPS-CD14 que se une a la proteína MD2. MD2 se une, junto con el LPS, al TLR4 y se forma un multímero con dos copias del complejo TLR4-MD2-LPS (Medzhitov *et al.*, 1997; Kawai y Akira 2010). Los receptores tipo Toll necesitan de moléculas adaptadoras intracelulares que se unen al dominio TIR para poder desencadenar una respuesta. Entre estas proteínas se encuentran: TIRAP y TRAM que unen MyD88 y TRIF, respectivamente. MyD88 activa a proteínas que sirven de segundos mensajeros en su señalización como a la proteína TRAF6 (una proteína clave en la cascada de señalización del TLR4), se recluta para activar al factor de transcripción NF $\kappa$ B y a

MAPKs que llevan al aumento en la transcripción del RNAm de citocinas inflamatorias como TNF.

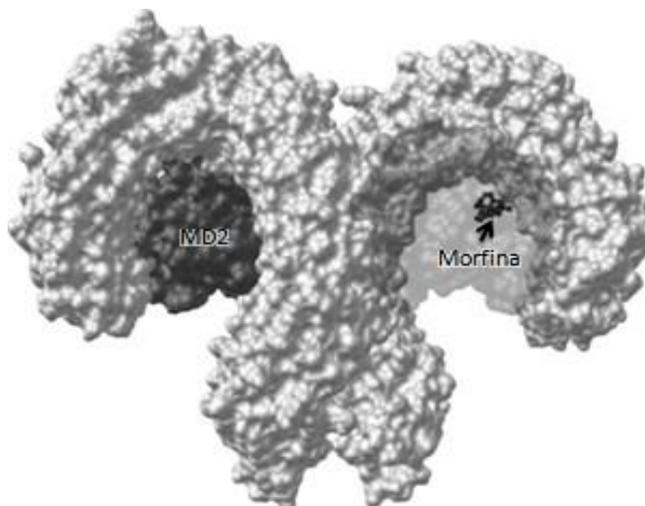
En una vía alterna, TRIF activa a NF-κB y a MAPKs, lo que lleva a la producción de IFN-1 y citocinas inflamatorias respectivamente (Kawai y Akira 2010). El factor de transcripción NF-κB usualmente se encuentra inactivo, por la acción de un inhibidor IκB. Tras la fosforilación del inhibidor, éste se desacopla de NF-κB y se trasloca al núcleo, donde se une a promotores específicos de la transcripción (Sternberg 2006).



**Figura 12. Señalización del TLR4.** La señalización comienza cuando se forma el dímero del receptor con ayuda de CD14, MD2 y LBP, tras la unión del LPS. Con ello se desencadena la cascada de señalización de MYD88, la cual recluta cinasas de la familia IRAK que ubiquitinan a TRAF6 para que ésta a su vez active a TAK1. TAK1 fosforila el complejo IKK que rompe la interacción de IκB (inhibidor de NF-κB) con NF-κB para que este último se trasloque al núcleo. TRAF6 también activa a las cinasas MAP3Ks para activar al factor de transcripción API. Por otro lado la vía independiente de MYD88 se lleva a cabo en el dominio TRIF que activa a IRF-3.

Los receptores TLR4 activan las dos vías descritas. La vía de TRIF se desencadena cuando el receptor es endocitado (Kawai y Akira 2010).

Investigaciones de la última década han demostrado que los agonistas opioides se unen de forma no estereoselectiva al receptor TLR4. Es decir, que este receptor reconoce agonistas opioides levógiros y dextrógiros. Sin embargo, sólo reconoce a los antagonistas opioides dextrógiros, como la (+)-naloxona. Estudios *in-silico* han demostrado que los opioides se unen al TLR4 con la ayuda de MD2, como se muestra en la figura 13 (Hutchinson *et al* 2010).



**Figura 13. Receptor TLR4 con la morfina acoplada al sitio de unión *in-silico*.** En negro se puede observar que la morfina se acopla al dímero de TLR4 y en gris oscuro a la proteína MD2. Tomada de Hutchinson *et al* 2010.

#### 1.4 Efectos de la morfina y el fentanilo en las células cebadas

Diversas investigaciones indican que la morfina puede inducir la expresión de citocinas proinflamatorias a través de la activación de NF- $\kappa$ B. También se ha observado que el receptor  $\mu$  puede modular la activación de NF- $\kappa$ B en microglía y neuronas (Bai *et al.*, 2014). Sin embargo, en otras células del sistema inmune los opioides actúan como inhibidores de la síntesis y secreción de citocinas.

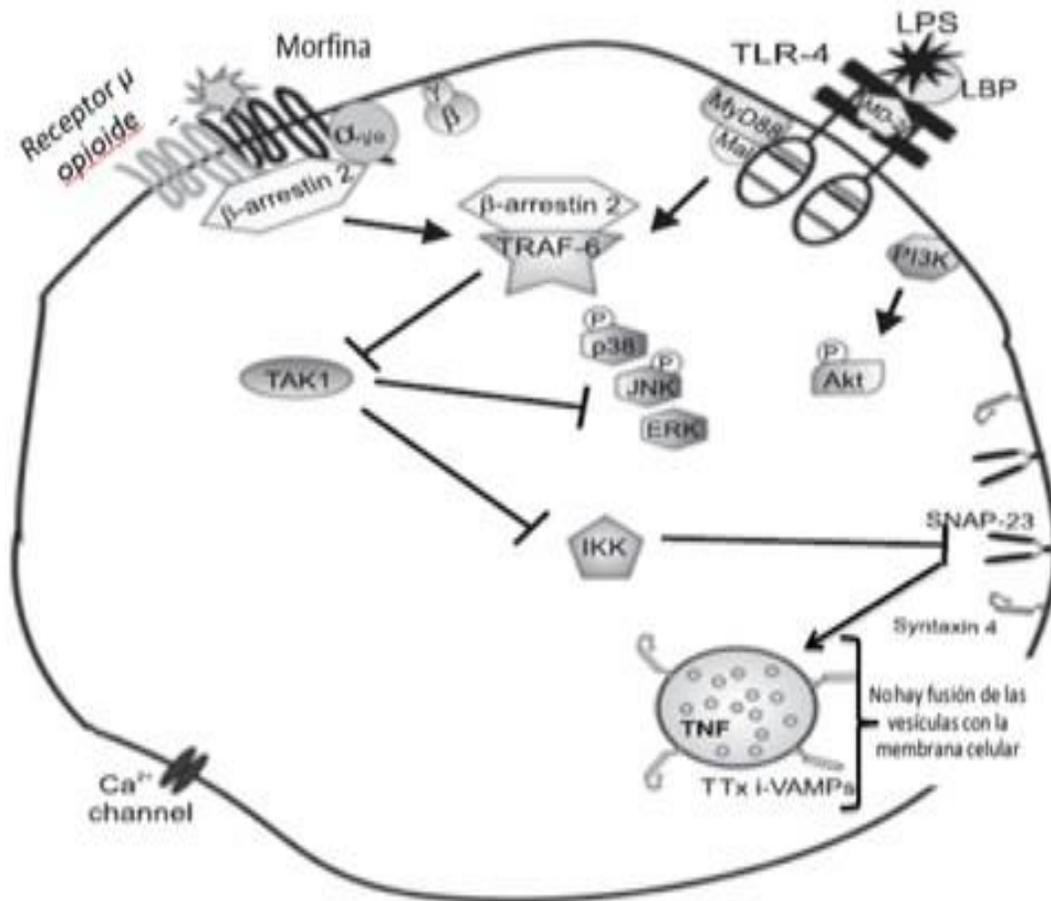
La morfina inhibe la secreción de TNF inducida por LPS en células cebadas derivadas de médula ósea (BMMCs por sus siglas en inglés). Además, *in vivo* la administración aguda de morfina inhibe la liberación de TNF de células cebadas de la cavidad peritoneal en respuesta a la activación del receptor TLR4 por el

LPS. Este efecto inhibitor se bloquea por naloxona, que es el antagonista de los receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  y por naltrindol, que es un antagonista selectivo  $\delta$  (Madera-Salcedo et al 2011 y Molina- Martínez et al 2014). Esto significa que el efecto de la morfina está mediado por receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$ .

El efecto inhibitor de la morfina en BMMCs depende de la  $\beta$ -arrestina, la cual regula negativamente a TRAF6, y con ello, impide la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B y de la vía de las MAPKs y de IKK $\alpha/\beta$ , evitando así la producción y secreción de citocinas (figura 14) (Madera-Salcedo et al 2013., Wang *et al.*, 2006).

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se propuso el siguiente mecanismo de acción de la morfina en BMMCs (figura 14). Como puede observarse, la morfina puede activar al receptor  $\mu$  y al receptor  $\delta$  generando que la proteína  $G_{i/o}$  se desacople del receptor para que la  $\beta$ -arr2 se una a los receptores. Una vez que la  $\beta$ -arr2 es activada por el receptor  $\mu$  o el receptor  $\delta$ , ésta se une a TRAF6. La unión de  $\beta$ -arr2 a TRAF6 impide que ésta se ubiquitine, deteniendo la fosforilación de las proteínas p38, JNK y ERK, disminuyendo así la síntesis de proteínas. Por otro lado, existen proteínas que ayudan a la fusión de la vesícula con la membrana blanco llamadas proteínas SNAP. En BMMCs la proteína SNAP 23 ayuda a la interacción de las vesículas que contienen TNF con la membrana plasmática para que este mediador inflamatorio se secrete. La SNAP-23 necesita ser activada por la proteína IKK, IKK es dependiente de TAK1 la cual también necesita ser fosforilada por TRAF6. Al no ubiquitinarse TRAF6 no hay una activación de segundos mensajeros, ni un acople de de las vesículas a la membrana para la secreción de TNF.

## Célula cebada



**Figura 14: Posible mecanismo de inhibición de la secreción de citocinas por acción de los opioides.** La morfina activa los receptores opioides, lo cual lleva a que la  $\beta$ -arr2 regule negativamente a TRAF-6, impidiendo que la cascada de señalización del TLR4 fluya y con ello genera una inhibición de la secreción de TNF. Modificada de Madera-Salcedo *et al* 2013.

## **2. Planteamiento del problema**

La morfina y el fentanilo difieren en su capacidad para internalizar al receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arrestina contribuye a este efecto. Las diferencias en señalización intracelular del receptor  $\mu$  activado por la morfina o por el fentanilo están asociadas a diferencias en el proceso del tráfico vesicular de este receptor. Por eso es importante estudiar las diferencias en el tráfico vesicular producidas por la morfina y el fentanilo en célula cebadas.

Así mismo, se sabe que los opioides tienen afinidad por el receptor TLR4. Por lo tanto es importante definir si el TLR4 tiene un papel en los efectos producidos por la morfina y el fentanilo.

## **3. Hipótesis**

El fentanilo producirá mayor internalización del receptor  $\mu$  que la morfina en BMMCs y la respuesta será independiente del receptor TLR4.

## **4. Objetivos**

### **4.1 General**

Evaluar las posibles diferencias en el tráfico vesicular del receptor  $\mu$  opioide en las células cebadas estimuladas con morfina o con fentanilo y determinar si el receptor TLR4 participa en estos efectos.

## 4.2. Objetivos particulares

- 1) Evaluar el tráfico por endosomas tardíos, nube perinuclear y endosomas de reciclamiento lento del receptor  $\mu$  activado por morfina y fentanilo en BMMCs.
- 2) Determinar si el TLR4 participa en los efectos observados con la morfina o con el fentanilo.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL6/J (cepa tipo silvestre) y C57BL6/J TLR4<sup>-/-</sup> que no expresan el receptor debido a una delección completa del gen *Tlr4*. Los ratones fueron adquiridos de laboratorios Jackson con los números de stock 003752 y 007227, respectivamente. Todos los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de cuidado y manejo de animales (NOM- 062-ZOO-1999) y fueron aprobados por nuestro Comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio bajo el protocolo CICUAL-0137-15

### 5.1 Fármacos y anticuerpos

Se utilizaron citrato de fentanilo y sulfato de morfina, (donados por el Instituto Nacional de Abuso de Drogas, NIDA (Carolina del Norte, Estados Unidos) y el antagonista opioide naloxona (clorhidrato de naloxona dihidratado) de Sigma Aldrich (N-7758). Los fármacos se disolvieron en solución salina 0.9 %.

Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: policlonal de conejo contra el receptor  $\mu$  (sc-15310), policlonal de cabra contra el receptor  $\mu$  (sc-7488), monoclonal de ratón contra  $\beta$ -arr2 (sc-365445), monoclonal de ratón contra Rab7 (sc-271608), monoclonal de ratón contra Rab11 (sc-166523), policlonal de conejo contra RNF26 (16802-1-AP). Los anticuerpos secundarios fueron: Alexa 568 de cabra contra conejo (A11037), Alexa 488 de cabra contra ratón (A-1101), Alexa 647 en burro contra cabra (A-21447) y Alexa 568 en burro contra conejo (A-10042).

### 5.2 Obtención de células cebadas

Los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> en una cámara destinada para tal fin. Se retiraron los huesos largos de las piernas y se obtuvo médula ósea mediante lavados con medio de cultivo RPMI-1640 (Biofluids) (SIGMA, cat: R4130-1L) suplementado. La médula ósea se extendió en cajas petri estériles, a las cuales se les añadió medio de cultivo RPMI. Posteriormente las células se

trasladaron a cajas de cultivo Nunc T-75 con 30 ml de medio de cultivo y se incubaron a 37 °C, con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se realizaron cambios de medio de cultivo semanalmente. Transcurridas entre 4 y 6 semanas de cultivo, se comprobó el fenotipo celular mediante la expresión de FcεRI determinada por citometría de flujo (Meurer, *et al* 2016).

El medio RPMI utilizado se preparó como se menciona a continuación: 20 ng/ml de IL-3 (Preprotech cat: 213.13), 1X de aminoácidos no esenciales (NEAA 100X, Biofluids cat: 332-100), 50 μM de β-mercaptoetanol (SIGMA cat: M6250), 25 nM del buffer HEPES (1 M, pH 7.7 SIGMA cat: H7006), 10 % de suero fetal bovino (FBS, GIBCO\_BRL cat: 261400779), 1 mM de piruvato de sodio (Biofluids cat: 33-100) y 1 U/ml de penicilina-0.1 mg/ml de estreptomicina (Gibco cat: 1378-016).

### **5.3 Estímulos de morfina, fentanilo y naloxona**

Antes de cada estímulo de morfina o fentanilo, las BMMCs fueron sensibilizadas con IgE de ratón (SPE7 Sigma) específica para el reconocimiento de dinitrofenol unido a albúmina sérica humana (DHP-HSA; Sigma cat. A6661) 100 ng/mL, por 24 h, a 37 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron a 250 xg, se resuspendieron en 500 μL de medio Tyrodes/BSA, a 37 °C y se mantuvieron en baño maría por 3 min antes de añadir los fármacos.

Las BMMCs (0.5 x10<sup>6</sup> células por condición), se estimularon con 1 mM de morfina o fentanilo en solución salina al 0.9%, a 37 °C, ya que estudios previos del laboratorio indican que esta concentración es la más efectiva para causar una disminución de la secreción de TNF inducida por LPS *in vitro* (Madera-Salcedo, *et al.* 2013).

Los tiempos de estimulación fueron los siguientes: 20 s, 1 min, 2.5 min, 5 min y 10 min. Para los experimentos con la naloxona las BMMCs sensibilizadas se trataron por 5 min con 10 μM de este antagonista, después de los cuales las células se estimularon con morfina o fentanilo 1 mM durante otros 5 min. Después

de los estímulos, las BMMcs se centrifugaron a 250 xg y se resuspendieron en 50  $\mu$ L PBS.

#### **5.4 Inmunofluorescencia**

Para detectar las proteínas de interés, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta, la cual se realizó como se describe a continuación.

Las BMMCs resuspendidas en PBS se colocaron en portaobjetos gelatinizados por 20 min para permitir su adherencia. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4 %, durante 20 min, en frío. Las células fijadas se lavaron 3 veces con PBS 1x y se bloquearon por 1 h con solución de bloqueo (1 % de BSA, suero fetal de cabra al 8.5 % en PBS 1x). Transcurrido este tiempo, las células se incubaron toda la noche a 4 °C en presencia de los anticuerpos primarios diluidos 1:100 en solución de bloqueo. Al terminar la incubación, las laminillas se lavaron 17 veces con PBS 1x, y se incubaron 2 h con anticuerpos secundarios (dilución 1:250) y DAPI (dilución 1:500). Posteriormente, se lavaron 17 veces con PBS 1x, se añadió medio de montaje ANTIFADE (invitrogen Ref: P7481) y se cubrieron con un cubreobjetos. Las laminillas se guardaron a temperatura ambiente, cubiertas de la luz, hasta su análisis. Las combinaciones de los anticuerpos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Combinaciones de anticuerpos

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Anticuerpos secundarios</b>
<b>Anti-MOR-1 (generado en contra el extremo N terminal del receptor <math>\mu</math>)</b> <b>Anti-<math>\beta</math>-Arrestin-2 (generado en contra el extremo C terminal, <math>\beta</math>-arr2 activa)</b>	Anti-rabbit Alexa 568 Anti-mouse Alexa 488
<b>Anti-MOR-1 (generado en contra el extremo amino terminal del receptor <math>\mu</math>)</b> <b>Anti-RNF26 (no específica contra que extremo está generado)</b>	Anti-goat Alexa 647 Anti-rabbit Alexa 568
<b>Anti-MOR-1 (generado en contra el extremo N terminal del receptor <math>\mu</math>)</b> <b>Anti-Rab7 (generado en contra el extremo C terminal)</b>	Anti-rabbit Alexa 568 Anti-mouse Alexa 488
<b>Anti-MOR-1 (generado contra el extremo N terminal del receptor <math>\mu</math>)</b> <b>Anti-Rab11(generado con el extremo C terminal)</b>	Anti-rabbit Alexa 568 Anti-mouse Alexa 488

### 5.5 Microscopía confocal

Las imágenes y el análisis de las inmunofluorescencias se realizaron en un microscopio confocal de la marca Zeiss LSM 800 modelo AX10 y un software ZEN 2.3 edición azul.

**Secciones transversales:** Para cada tratamiento, se analizaron 3 campos visuales con 3 células por campo de 3 cultivos diferentes teniendo un total de 27 células para cada estímulo.

Las imágenes de z-stack para célula completa se obtuvieron haciendo cortes cada micra. Dependiendo del tamaño de las células, se obtuvieron de 6 a 12 rebanadas por stack (panel A, figura 13).

Las imágenes fueron adquiridas en tres canales diferentes: El canal 1 para la fluorescencia Alexa 568 o Alexa 647. El canal 2 para la fluorescencia Alexa 488 o Alexa 568, en la cual se cargó el detector de luz transmitida ESID, para delimitar la membrana y el canal 3 para el colorante nuclear DAPI.

## 5.5 Análisis de las imágenes

De las imágenes se analizaron el porcentaje de área, la colocalización y el perfil de intensidad de fluorescencia utilizando el software ZEN 2.3 edición azul del microscopio confocal.

### 5.5.1 Porcentajes de área

Tomando el área de cada célula como 100% se obtuvo el porcentaje de área ocupada por el receptor  $\mu$  solo (color rojo de la imagen), de  $\beta$ -arr2 activa sola (color verde de la imagen) y de la colocalización de ambas proteínas (color amarillo de la imagen).

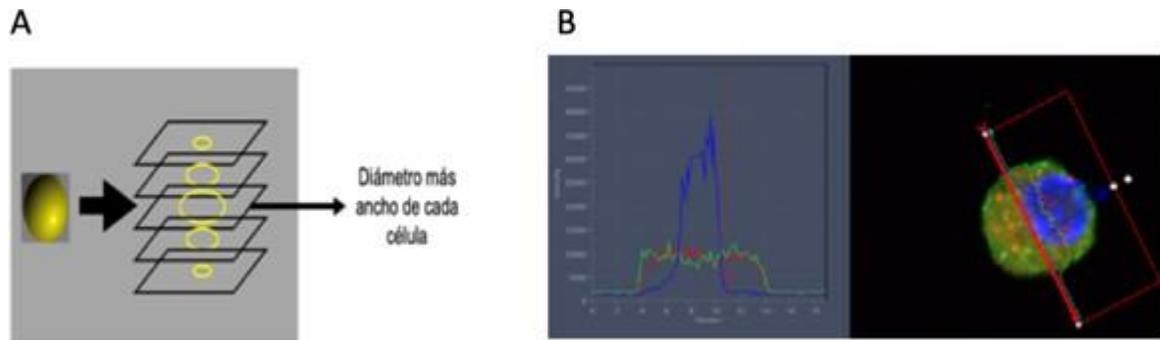
### 5.5.2 Colocalización

Para el análisis de colocalización entre las proteínas de interés se obtuvo el coeficiente de Manders que mide la co-ocurrencia de dos fluoróforos, independiente de la intensidad de la señal y eliminando el fondo. Este coeficiente indica el grado en que dos moléculas se encuentran en un mismo plano celular. Sus valores pueden ir desde cero, cuando las dos marcas no coinciden en algún punto y hasta 1, cuando ambas marcas están en el mismo punto del plano celular (Manders et al., 1993; Dunn *et al.*, 2011).

### 5.6.3 Perfil de fluorescencia

Para el análisis de la intensidad de los fluoróforos en un corte transversal a través de la célula, se tomó el corte que correspondiera al diámetro más grande en el eje z. Se trazó una línea recta atravesando la célula, tratando de que el núcleo quedara lo más centrado en este vector que iniciaba aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  antes y finalizaba 3  $\mu\text{m}$  después del borde de la célula, como se muestra en la figura 15, panel B. El programa proporcionó los valores de las intensidades correspondientes a cada fluoróforo por micras del diámetro de la célula. Estos

datos se normalizaron, asignando el valor de 1 a la intensidad máxima de cada fluoróforo por célula.



**Figura 15. Ejemplo de las mediciones del perfil de fluorescencia.** Por cada célula se tomó el corte medio como se muestra en el panel A. Se trazó un vector tratando que el núcleo quedara en medio de éste como se muestra en el panel B derecho. El software del microscopio confocal proporcionó los valores de las intensidades correspondientes a cada fluoróforo por micras a lo largo de la célula (panel B izquierdo). Los valores se normalizaron asignando el valor de 1 a la intensidad máxima de señal en cada célula.

## 5.6 Diseño experimental

### 5.6.1 Evaluación del tráfico vesicular del receptor $\mu$ activado por morfina o fentanilo en BMMCs

Las diferencias en tráfico vesicular del receptor  $\mu$  en BMMCs inducidas por morfina y por fentanilo se determinaron mediante cursos temporales para cada fármaco y se evaluó la colocalización del receptor  $\mu$  con las distintas proteínas asociadas al estadio específico del tráfico vesicular.

Se evaluó un curso temporal para ambos fármacos a los 20 s, 1 min, 2.5 min, 5 min y 10 min, se evaluó la solución salina por 10 min como control. Después se determinó como cambiaron los siguientes parámetros con cada uno de los estímulos:

- Perfil de intensidad de fluorescencia del receptor  $\mu$  y  $\beta$ -arr2 activa
- Colocalización del receptor  $\mu$  y  $\beta$ -arr2 activa mediante el coeficiente de Manders
- Porcentaje de área ocupada por el receptor  $\mu$  solo
- Porcentaje de área correspondiente a la  $\beta$ -arr2 activa sola
- Porcentaje de área de colocalización del receptor  $\mu$  y  $\beta$ -arr2 activa

Debido a que en condiciones basales el receptor  $\mu$  ya se encontraba en el citoplasma de la célula, se eligió trabajar con endosomas tardíos y de reciclamiento lento. Para determinar si la morfina y el fentanilo inducen el tráfico del receptor  $\mu$  por estos endosomas, se estimularon a las BMMCs con ambos fármacos por 2.5 min o 5 min y al grupo control con solución salina por 10 min. Posteriormente se compararon las variaciones del coeficiente de Manders del receptor  $\mu$  con Rab 7 o con Rab 11 y se estableció si había diferencias entre los estímulos.

Para evaluar si la morfina y el fentanilo inducen una asociación del receptor  $\mu$  con la nube perinuclear, las BMMCs se estimularon por 5 min con cada uno de los

fármacos tiempo al cual ya se había observado cambios con las comparaciones de las Rabs y con solución salina por 10 min como control. Se determinó el coeficiente de Manders del receptor  $\mu$  con la proteína RNF26 en respuesta a cada estímulo.

### **5.6.2 Determinación del TLR4 en los efectos observados con la morfina y con el fentanilo.**

Con el propósito de determinar si el receptor TLR4 participa o no en los efectos observados con la morfina y con el fentanilo sobre el tráfico vesicular del receptor  $\mu$  en BMMCs se propuso trabajar con (-)-naloxona debido a que es antagonista únicamente del receptor  $\mu$  y no tiene efecto sobre el TLR4.

Se administró (-)-naloxona a las BMMCs por 5 min antes de la morfina o del fentanilo por 5 min más. Después, se compararon las variaciones del el coeficiente de Manders entre el receptor  $\mu$  y  $\beta$ -arr2 activa correspondientes a cada estímulo con los controles. Los controles fueron células tratadas con (-)-naloxona por 5 min o solución salina por 10 min.

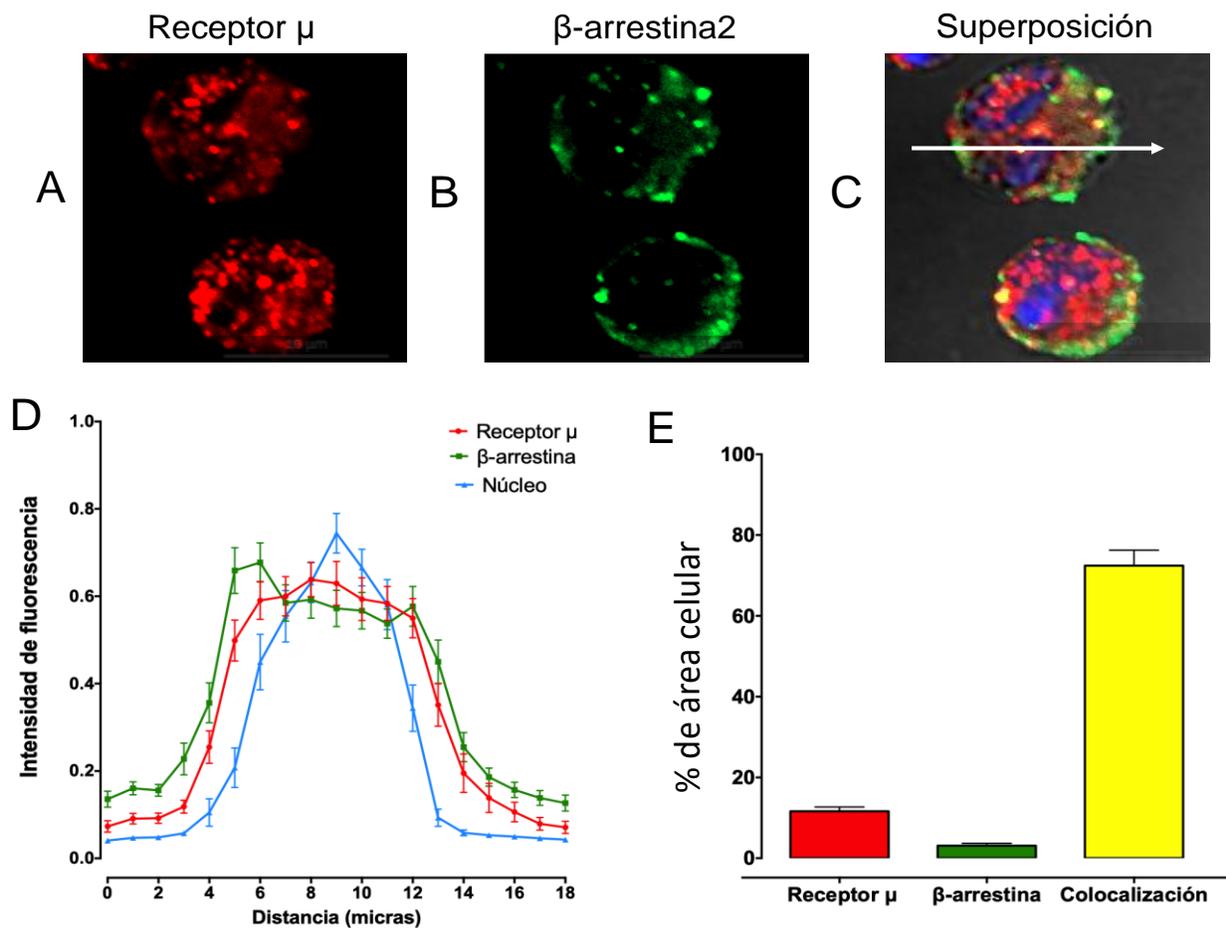
## 6. Resultados

### 6. 1 Tráfico vesicular del receptor $\mu$ activado por morfina o fentanilo en BMMCs.

#### 6.1.1 En condiciones basales el receptor $\mu$ se encuentra internalizado y colocalizando con $\beta$ -arr2 activa en BMMCs.

Nuestro primer objetivo fue caracterizar la distribución de los receptores  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 activa en CCs en condiciones basales. Para esto se realizaron inmunofluorescencias, para identificar el receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 en BMMCs estimuladas únicamente con solución salina por 10 min.

En la figura 16 se observan las imágenes representativas del corte medio de células en condiciones control. Como se puede observar el receptor  $\mu$  se encuentra en el citoplasma (marca roja panel A) formando agregados. La  $\beta$ -arr2 activa (marca verde panel B) tiene tanto una localización membranal como intracelular. Cuando se unen las imágenes de ambas marcas, se observa la colocalización del receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 activa (marca amarilla panel C) en el citoplasma de las BMMCs. El valor del coeficiente de Manders fue de aproximadamente 0.87. La intensidad de fluorescencia (panel D) es mayor en la parte central de las células. En el panel E se muestra el porcentaje de área celular ocupada por el receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 solos y unidos. Cerca del 72% del área celular está ocupada por el receptor  $\mu$  unido a la  $\beta$ -arr2 activa. Esta última se encontró en alrededor del 3 % del área celular.



**Figura 16. Localización del receptor  $\mu$  opioide y la  $\beta$ -arr2 activa en células cebadas no estimuladas.** Imagen representativa de los controles en BMMCs A) receptor  $\mu$  en rojo, B)  $\beta$ -arr2 en verde C) superposición de ambas marcas. La flecha blanca representa el vector trazado para medir el perfil de intensidad de fluorescencia. D) Perfil de intensidad de fluorescencia de los cortes medios de las BMMCs controles. Las flechas grises indican aproximadamente el inicio y el final de las células. Cada punto corresponde al promedio el  $\pm$  E.E. de 27 células. E) Porcentajes de área celular ocupada por las dos marcas. Las barras representan el promedio de 27 células  $\pm$  el E.E.

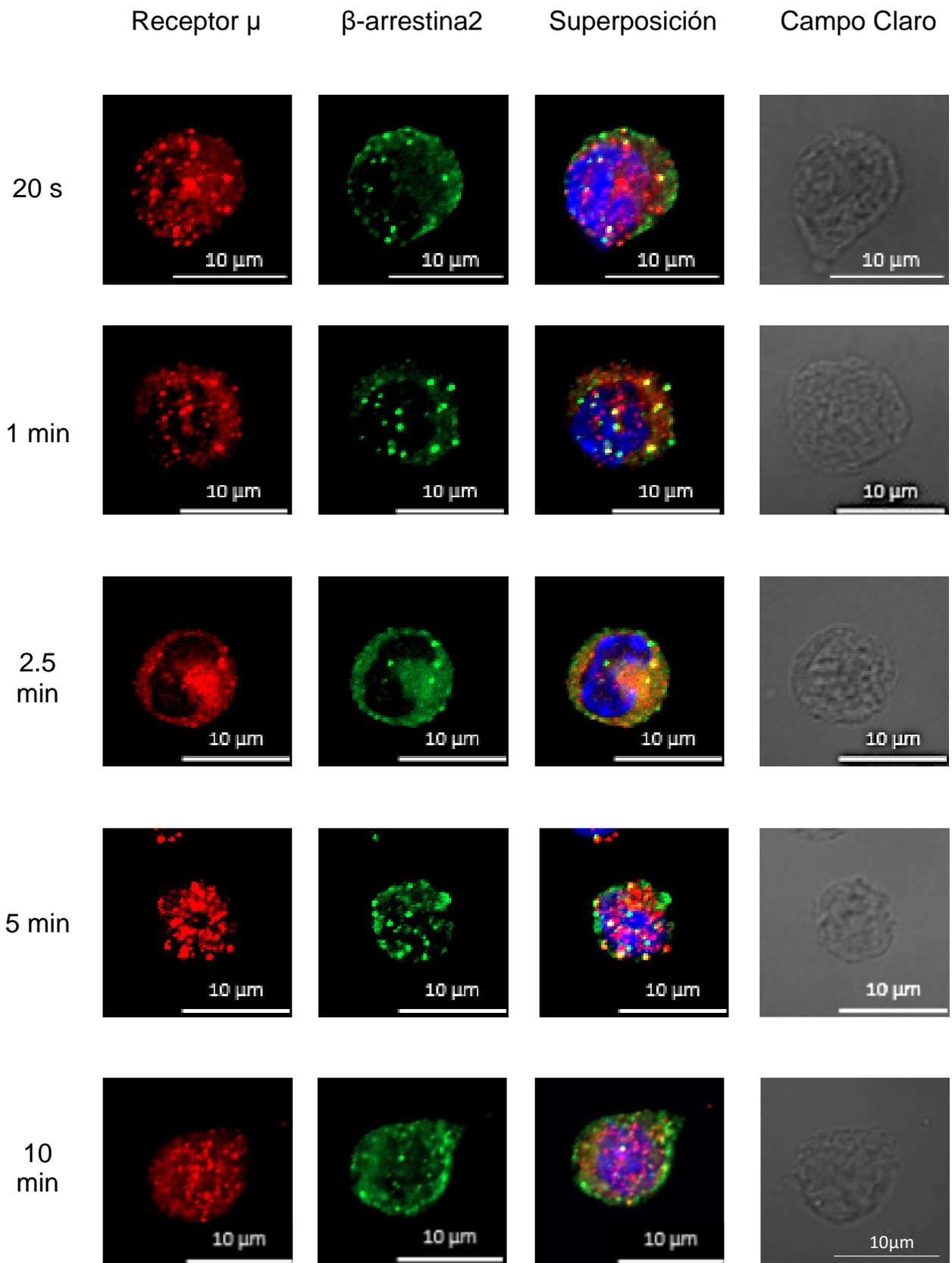
## 6.1.2 La morfina y el fentanilo aumentan la colocación del receptor $\mu$ con $\beta$ -arr2 activa en BMMCs

Las posibles diferencias del tráfico vesicular inducido por morfina y fentanilo fueron determinadas mediante cursos temporales con ambos fármacos a 20 s, 1 min, 2.5 min, 5 min, 10 min y solución salina a los 10 min como control.

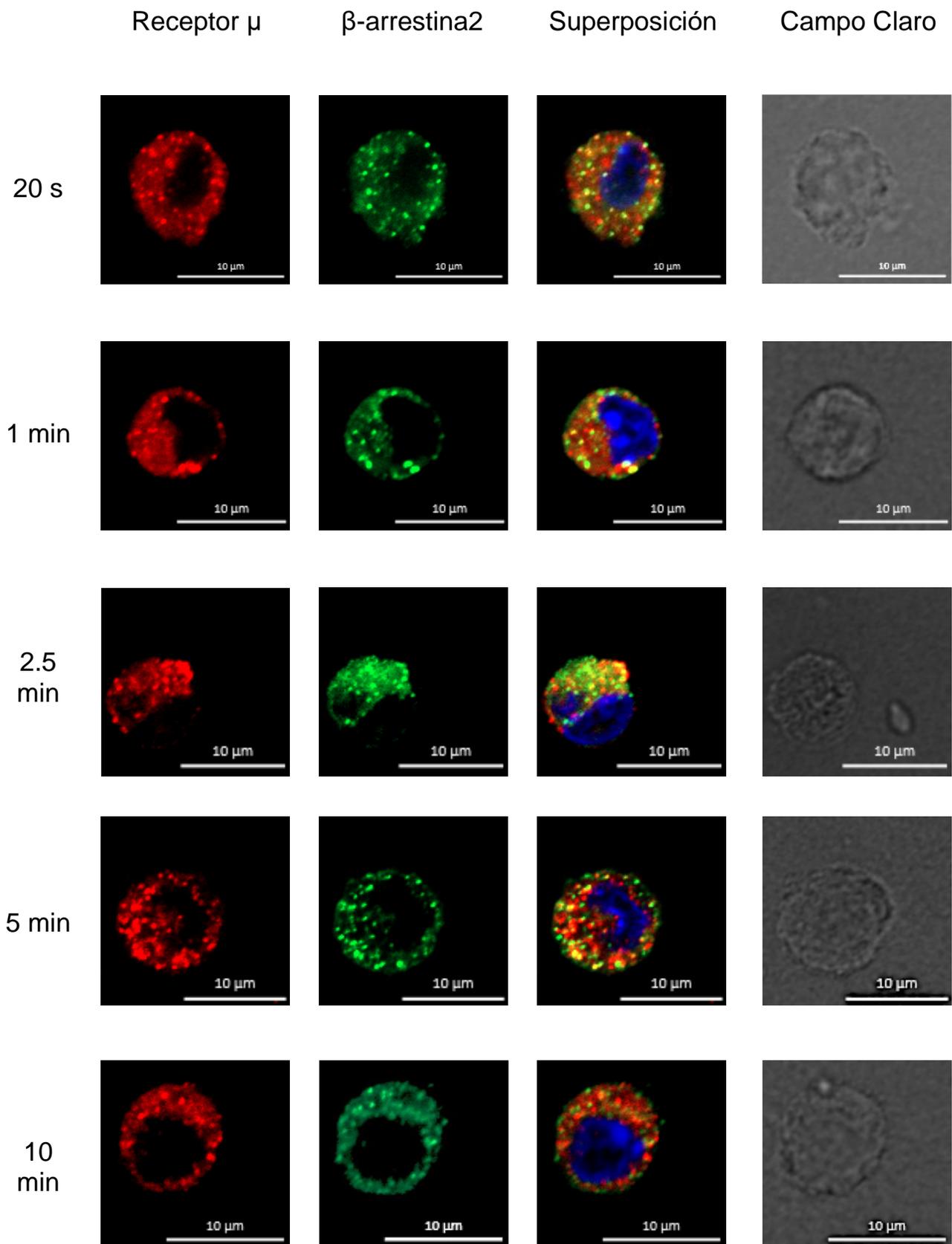
Las figuras 17 y 18 muestran imágenes representativas de la distribución del receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 en BMMCs a diferentes tiempos después de la administración de morfina o fentanilo.

En la figura 17 se muestra como la morfina induce un cambio en la distribución del receptor  $\mu$  que se detecta cercano al núcleo a los 20 s de su administración. Transcurrido un minuto, la marca del receptor  $\mu$  asociada a la  $\beta$ -arr2 aumenta cerca del núcleo (marca amarilla) y esta ubicación se mantiene a los 2.5 min y a los 5 min. A los 10 min del estímulo el receptor  $\mu$  unido a la  $\beta$ -arr2 se mantiene cerca del núcleo y también se observa a la  $\beta$ -arr2 distribuída por todo el citoplasma.

A diferencia de lo observado con la morfina, el fentanilo (figura 18) aumenta la localización del receptor  $\mu$  asociado a la  $\beta$ -arr2 (marcas amarillas) en la periferia del núcleo y citoplasma desde los 20 s. Este patrón de localización se mantuvo durante los todos los tiempos de estimulación, a diferencia de lo observado con la morfina donde a los 10 min la  $\beta$ -arr2 ya se observa en citoplasma a los 10 min.

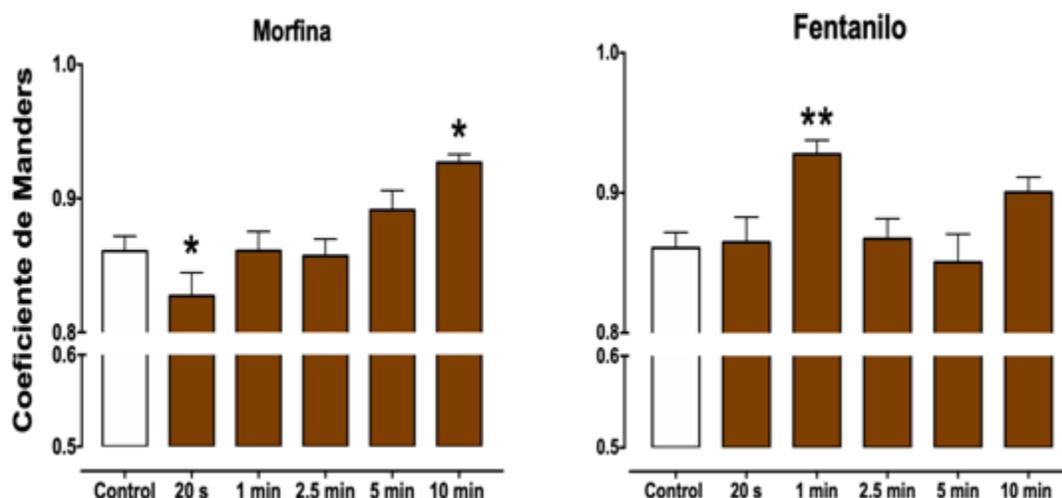


**Figura 17. Imágenes representativas de los cortes medios de las células marcando al receptor  $\mu$  y a la  $\beta$ -arr2 activa a los diferentes tiempos de estimulación con morfina. Se muestra a una célula representativa de un total de 27. En rojo se observa el receptor  $\mu$ , en verde la  $\beta$ -arr2 y en azul, el núcleo. El amarillo indica colocalización. También se muestra una imagen de campo claro de las células.**



**Figura 18.** Imágenes representativas de los cortes medios de las células marcadas con el receptor  $\mu$  y a la  $\beta$ -arr2 activa a los diferentes tiempos de estimulación con fentanilo: Se muestra a una célula representativa de un total de 27. En rojo se observa el receptor  $\mu$ , en verde la  $\beta$ -arr2 y en azul al núcleo. El amarillo indica colocalización en la imagen de superposición. También se muestra una imagen de campo claro de las células.

Estos resultados indican que la morfina y el fentanilo inducen diferente cinética de colocación del receptor  $\mu$  con  $\beta$ -arr2. En la figura 19 se muestra el coeficiente de Manders en células tratadas con morfina o fentanilo a los diferentes tiempos. La morfina primero disminuye significativamente la colocación mientras a los 10 min se registra un aumento significativo. El fentanilo aumenta significativamente el coeficiente durante el primer minuto y después el valor regresa a niveles control.



**Figura 19. Coeficientes de Manders del receptor  $\mu$  y  $\beta$ -arr2 en respuesta a los estímulos de morfina y fentanilo en BMMCs.** Las barras representan el promedio de 27 células  $\pm$  E.E. Prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnett \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, con respecto al control.

Los perfiles de intensidad de fluorescencia obtenidos del análisis de 27 células dan otra aproximación de lo observado en las imágenes representativas de los cursos temporales de morfina y fentanilo presentadas anteriormente. En el caso de la morfina (figura 20) a los 20 s el perfil de intensidad de fluorescencia de las dos proteínas analizadas parece no cambiar, en comparación con el control (figura 16). Sin embargo, al minuto de la estimulación con la morfina el receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 se ven unidos rodeando al núcleo. Esta distribución se mantiene durante los siguientes tiempos. Por otro lado, en respuesta al fentanilo (figura 21) el receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 mantienen una distribución citoplasmática sin rodear por completo al núcleo desde los 20 s que no varía con el tiempo.

# Morfina

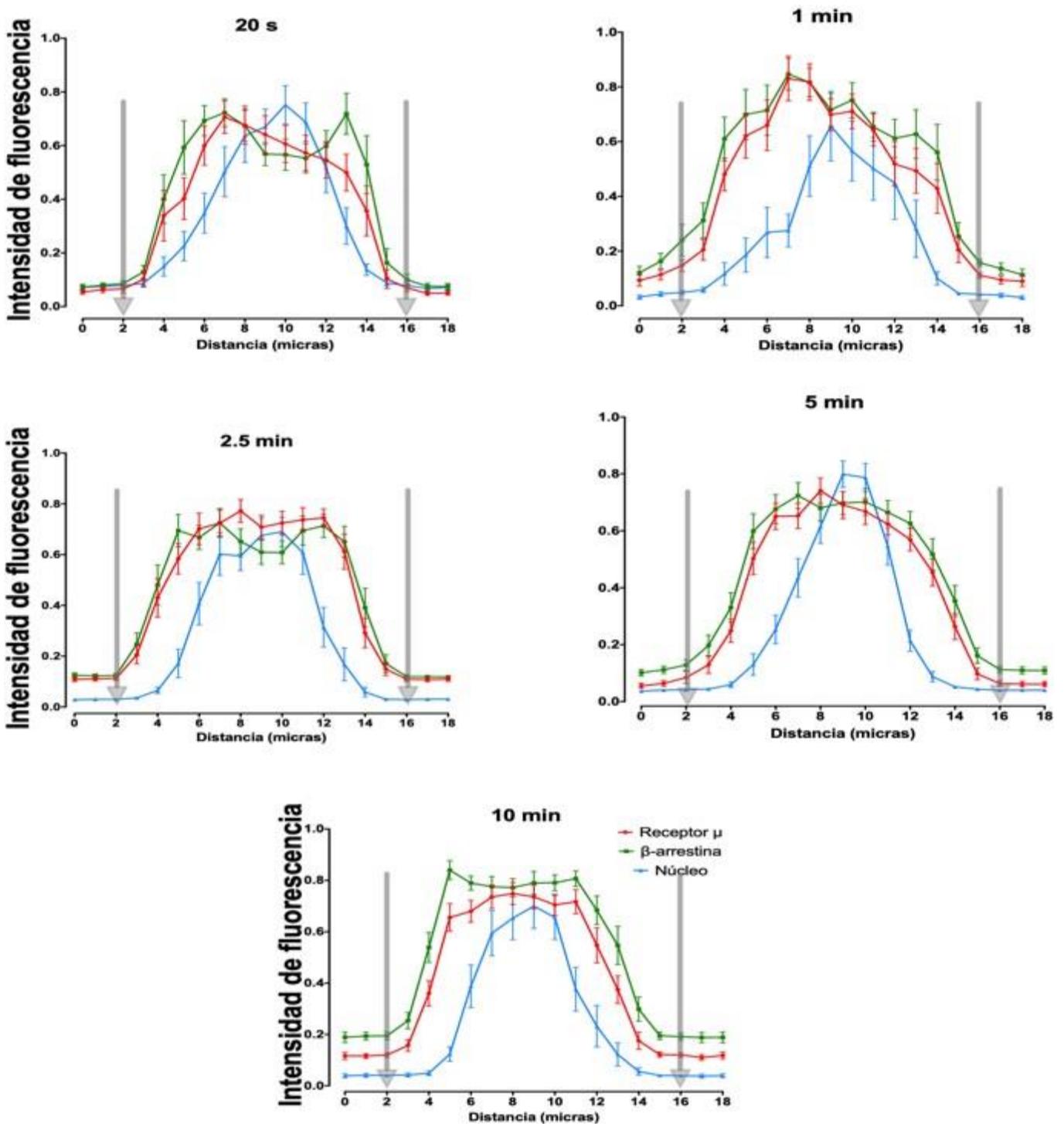


Figura 20. Perfiles de intensidad de fluorescencia del receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 en cortes medios de células estimuladas con morfina. Las flechas grises representan aproximadamente el inicio y final de la célula. Cada punto corresponde al promedio  $\pm$  E.E. de 27 células.

# Fentanilo

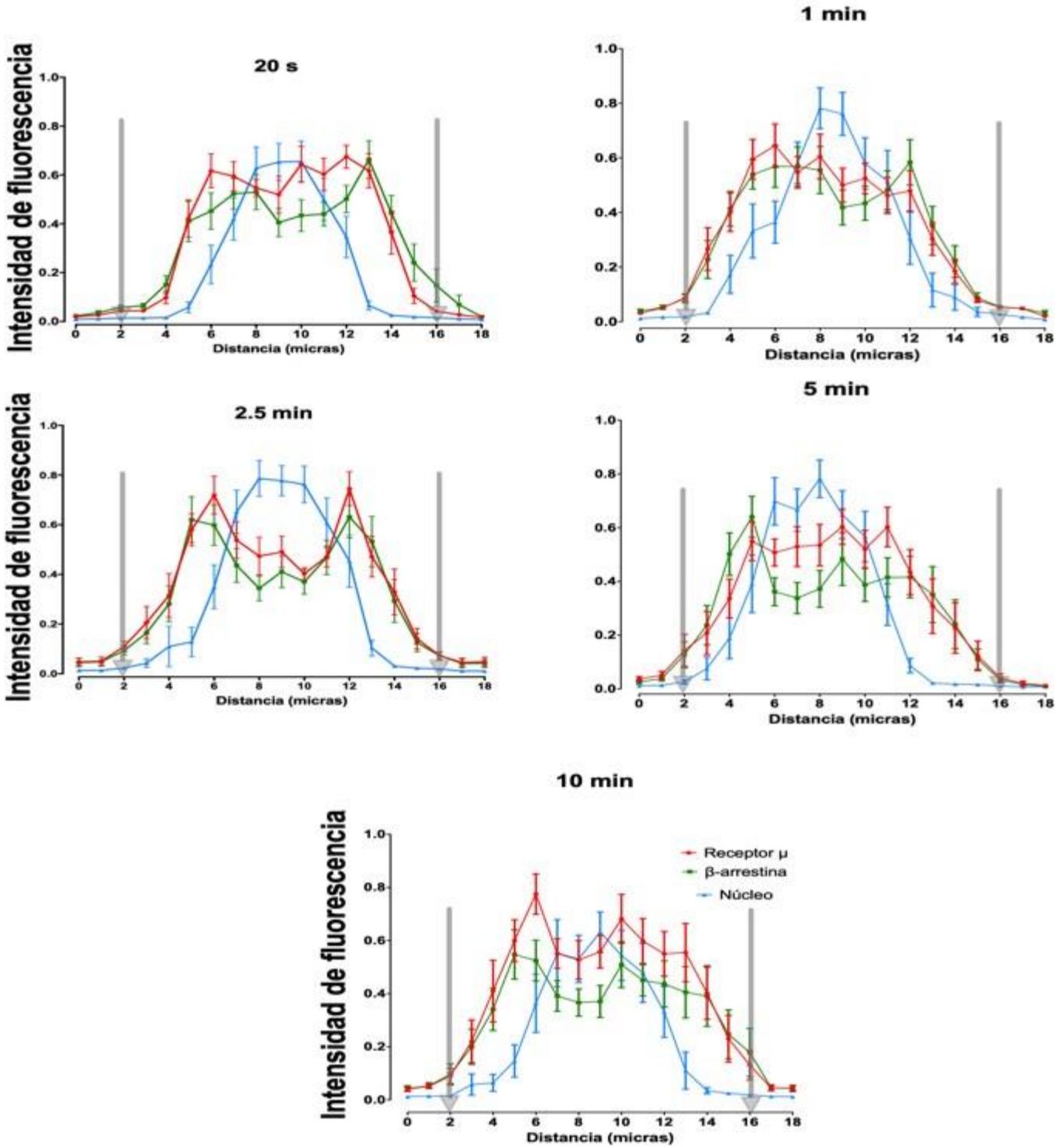


Figura 21. Perfiles de intensidad de fluorescencia del receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 en cortes medios de células estimuladas con fentanilo: Las flechas grises representan aproximadamente el inicio y final de la célula. Cada punto corresponde al promedio  $\pm$  E.E. de 27 células.

### **6.1.3 La morfina y el fentanilo aumentan el porcentaje de área de la $\beta$ -arr2 activa en BMBCs**

Como se mencionó el anticuerpo contra  $\beta$ -arr2 solo reconoció a la proteína en su estado activo. Los porcentajes de área celular de las proteínas analizadas (el receptor  $\mu$  solo, la  $\beta$ -arr2 activa sola y el área de las dos proteínas juntas) se compararon entre los tiempos de estimulación de ambos fármacos con los controles. Los resultados se muestran en la figura 22.

Después de la administración de la morfina se observa una disminución del porcentaje de área ocupado por el receptor  $\mu$  solo, tanto a los 5 min como a los 10 min. Por otro lado, el área ocupada por la  $\beta$ -arr2 activa sola muestra una reducción seguida de un aumento progresivo hasta alcanza su máximo a los 10 min post-estimulación. El aumento máximo fue significativamente mayor que el porcentaje de área inicial ocupada por la  $\beta$ -arr2 activa.

La administración del fentanilo causa un aumento ligero pero significativo del área correspondiente al receptor  $\mu$  solo a los 20 min. Después se registra una disminución significativa al min 1 para posteriormente retornar a valores basales. El área ocupada por la  $\beta$ -arr2 activa sola aumenta a los pocos segundos después de la administración con fentanilo, alcanza su máximo al minuto y posteriormente regresa a niveles basales. El aumento máximo del área de la  $\beta$ -arr2 activa fue estadísticamente significativo al compararlo con el control.

Con ambos fármacos, el área correspondiente al receptor  $\mu$  solo tiene su máxima disminución al mismo tiempo que el área de la  $\beta$ -arr2 activa sola tiene su máximo aumento.

El área de colocación entre el receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 activa disminuye únicamente con los estímulos de fentanilo a los 20 s y 2.5 min .

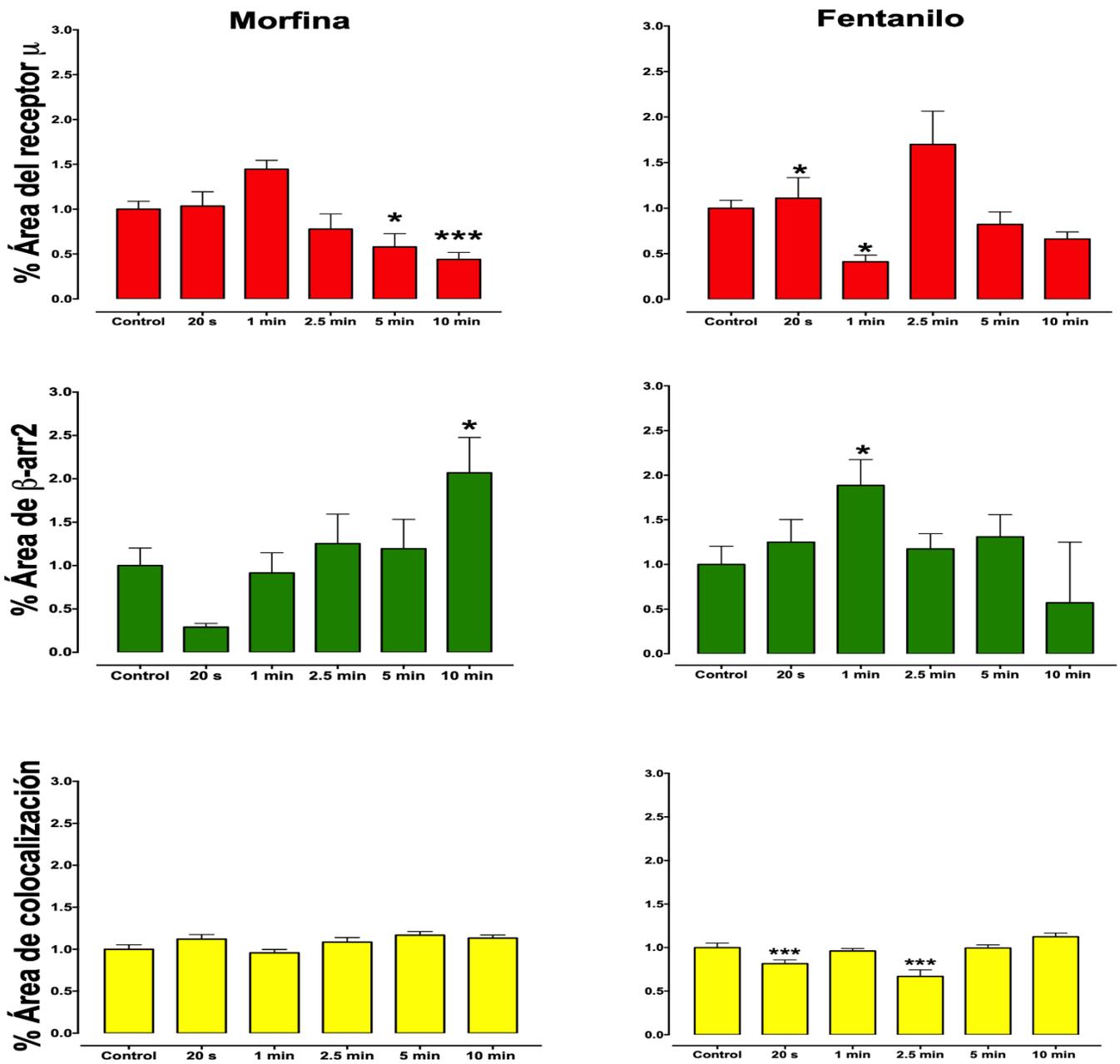
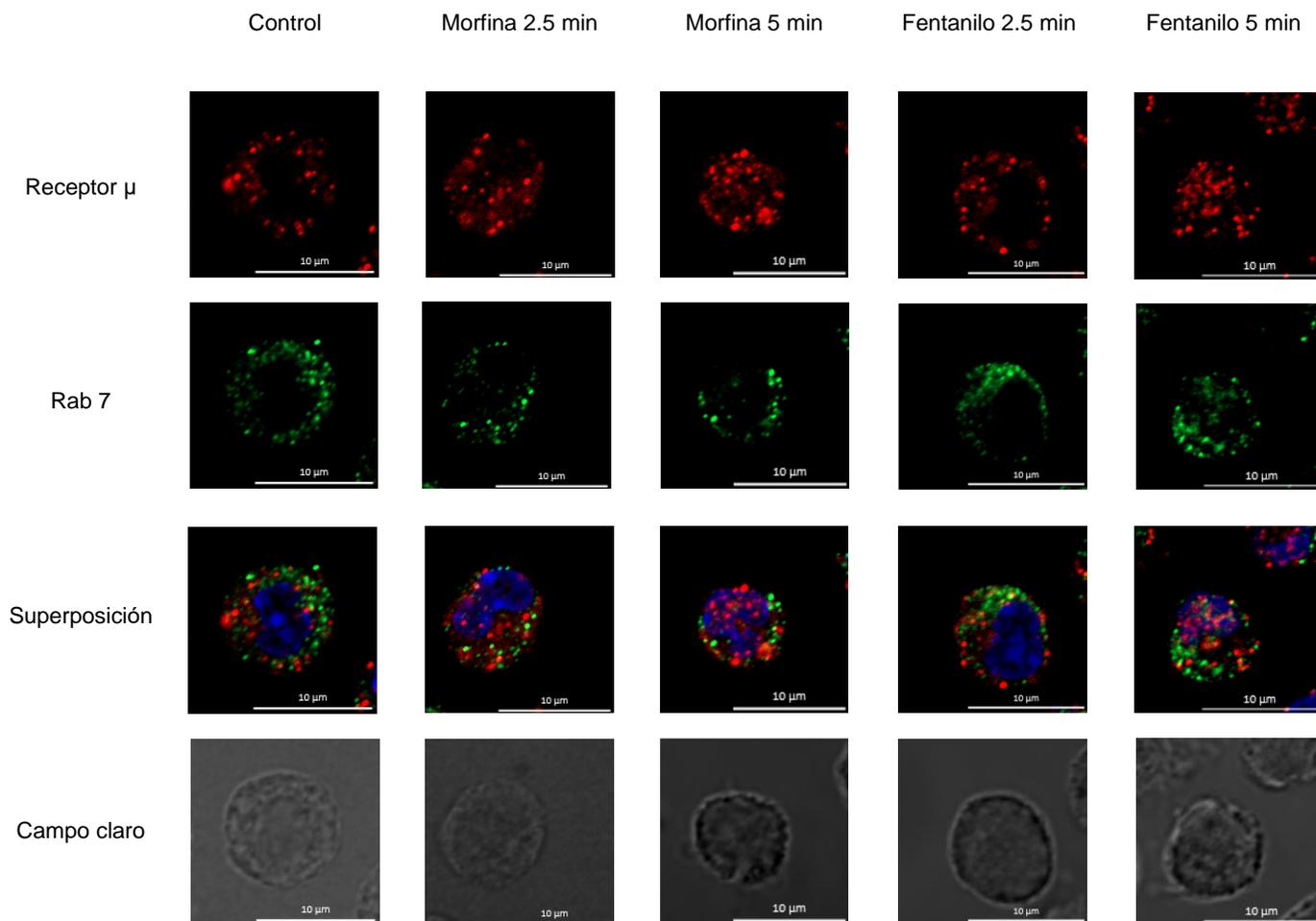


Figura 22. Porcentajes de área celular ocupados por el receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 activa en respuesta a los tiempos de estimulación con la morfina o el fentanilo en BMMCs: Los porcentajes se normalizaron respecto al promedio del control. Las barras representan el promedio de 27 células  $\pm$  E.E. Prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnett. \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001, con respecto al control.

#### **6.1.4 La morfina disminuye la localización del receptor $\mu$ en los endosomas tardíos**

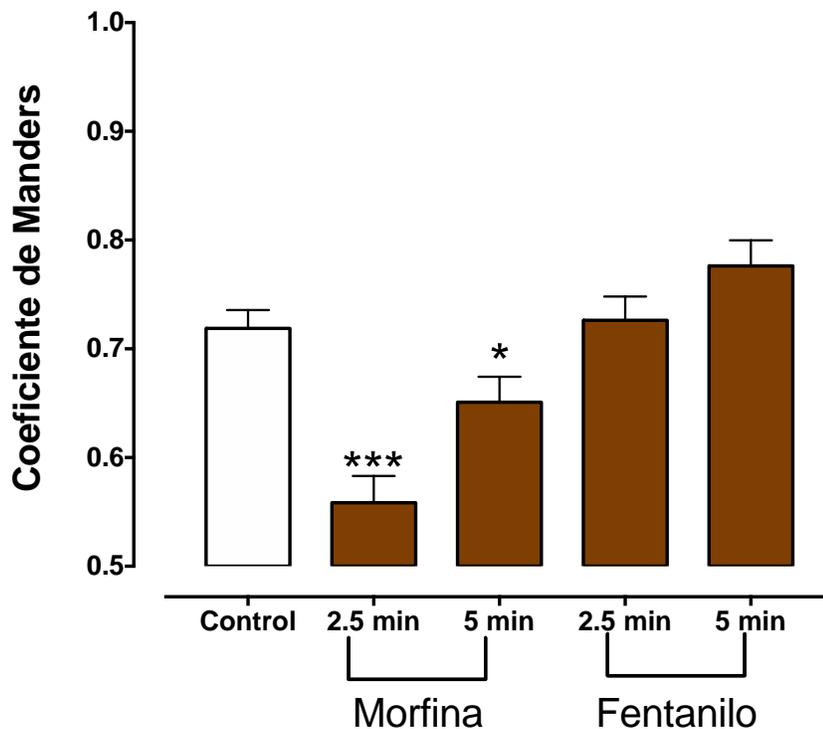
El tráfico del receptor  $\mu$  por endosomas tardíos y de reciclamiento lento dado por la morfina y por el fentanilo se analizó a través de determinar la colocalización del receptor  $\mu$  con las GTPasas Rab 7 y Rab 11 respectivamente. Se hicieron las determinaciones en condiciones basales, a los 2.5 min y a los 5 min después de la administración de los agonistas opioides.

La figura 23 muestra imágenes representativas a los tiempos evaluados y la colocalización entre el receptor  $\mu$  y Rab 7. Como puede observarse el receptor  $\mu$  se distribuyen por todo el citoplasma celular y alrededor del núcleo (espacio perinuclear), mientras que Rab 7 solo se encuentra en el citoplasma, la cantidad de agregados colocalizando (marca amarilla) fue poca. La localización del receptor  $\mu$  y Rab 7 no varía con los diferentes estímulos.



**Figura 23. Imágenes representativas de los cortes medios de las células estimuladas con morfina o fentanilo con marcas para el receptor  $\mu$  y Rab 7.** Se muestra una célula representativa de un total de 27 analizadas. En rojo, se encuentra el receptor  $\mu$ , en verde, Rab 7 y en azul, el núcleo. También se muestran imágenes de campo claro de las células.

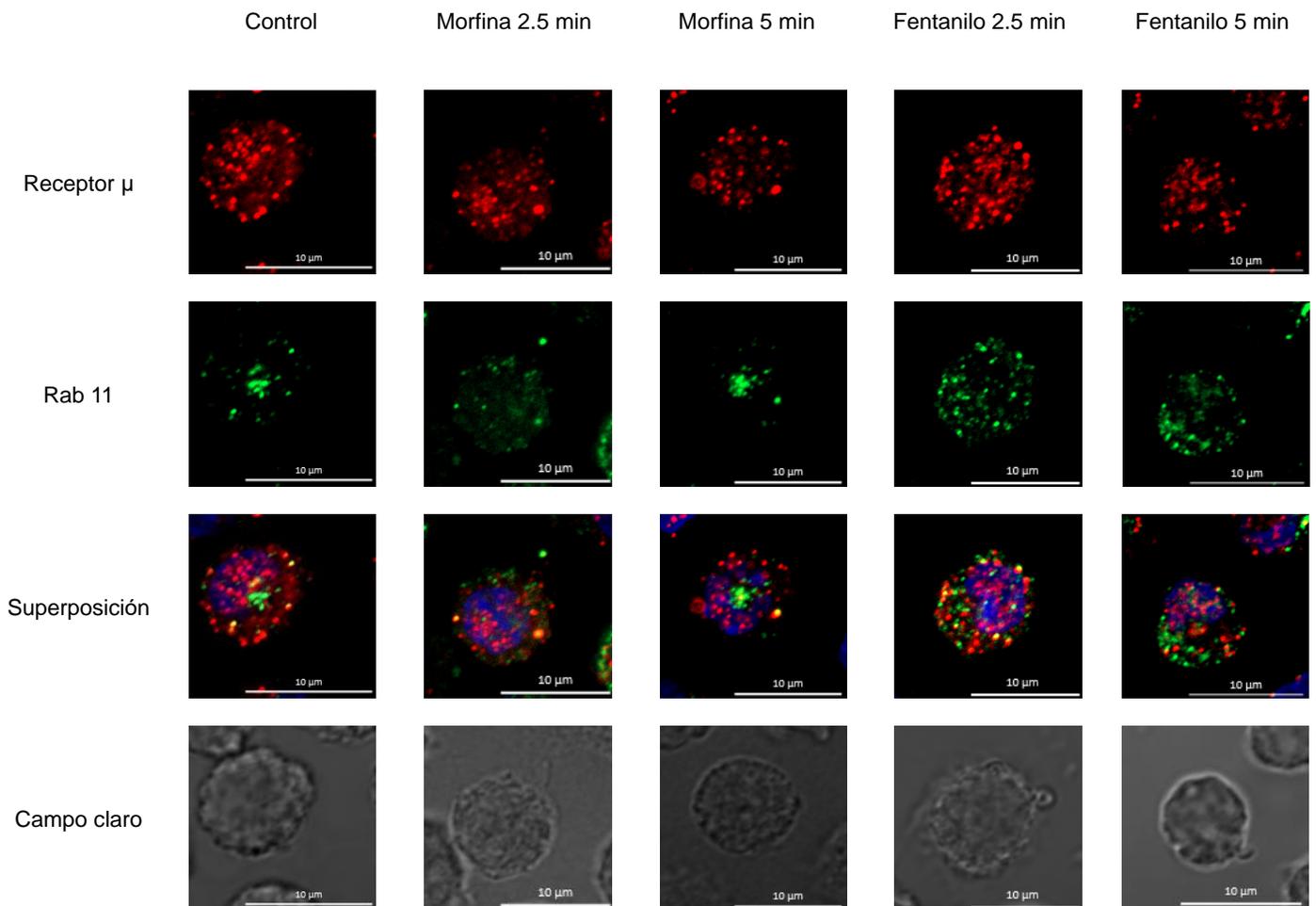
El coeficiente de colocación de Manders (figura 24) muestra que, desde condiciones basales, una proporción importante del receptor  $\mu$  que colocaliza con Rab 7. A los 2.5 min y 5 min después de la estimulación con morfina hay una disminución significativa en la localización de ambas marcas. El fentanilo, en cambio, no generó ninguna variación significativa del coeficiente de Manders del receptor con Rab7.



**Figura 24. Coeficiente de Manders de la colocación entre el receptor  $\mu$  y Rab 7 en BMMCs estimuladas con morfina o fentanilo.** Las barras representan el promedio de 27 células  $\pm$  el E.E. Prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba Dunnett \*  $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  con respecto al control.

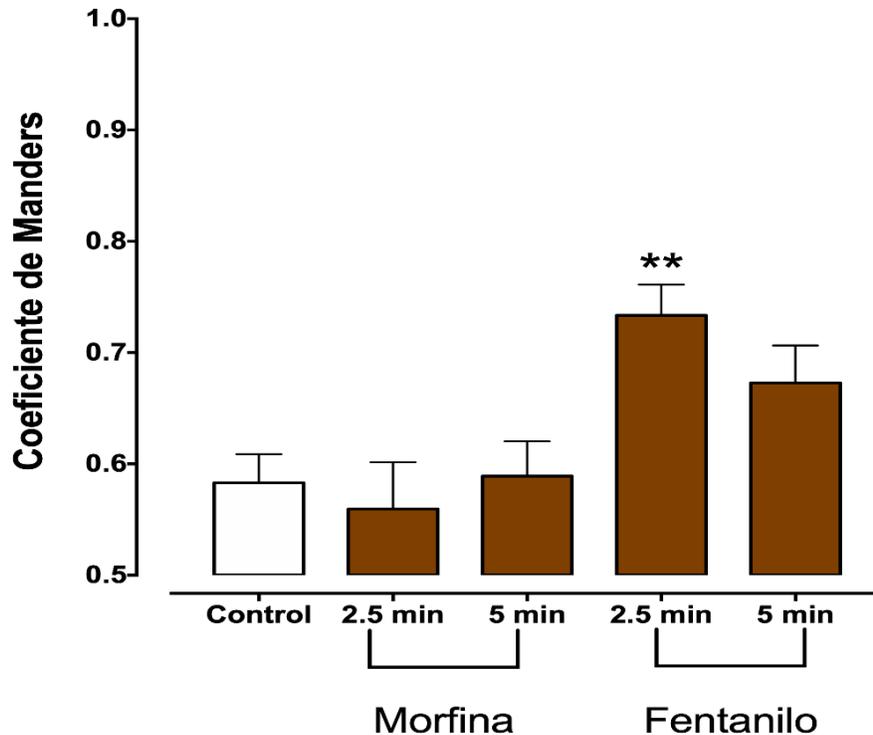
### 6.1.5 El fentanilo induce el tráfico vesicular del receptor $\mu$ por endosomas de reciclamiento tardío

La figura 25 muestra las imágenes representativas de BMMCs para la colocalización del receptor  $\mu$  en endosomas de reciclamiento tardío a los tiempos evaluados. El receptor  $\mu$  forma agregados grandes que se distribuyen por todo el citoplasma y en el núcleo, mientras que Rab 11 forma menos agregados únicamente en el citoplasma. Hay poca cantidad de agregados colocalizando (marca amarilla) y la mayoría están cerca del núcleo.



**Figura 25.** Imágenes representativas de los cortes medios de las células estimuladas con morfina o fentanilo con marcas para el receptor  $\mu$  y Rab 11. Se muestra a una célula representativa de un total de 27. En rojo se observa el receptor  $\mu$ , en verde, a Rab 11 y en azul, el núcleo. La marca amarilla de las células colocalización entre el receptor  $\mu$  y Rab 11, También se muestra imágenes de campo claro de las células.

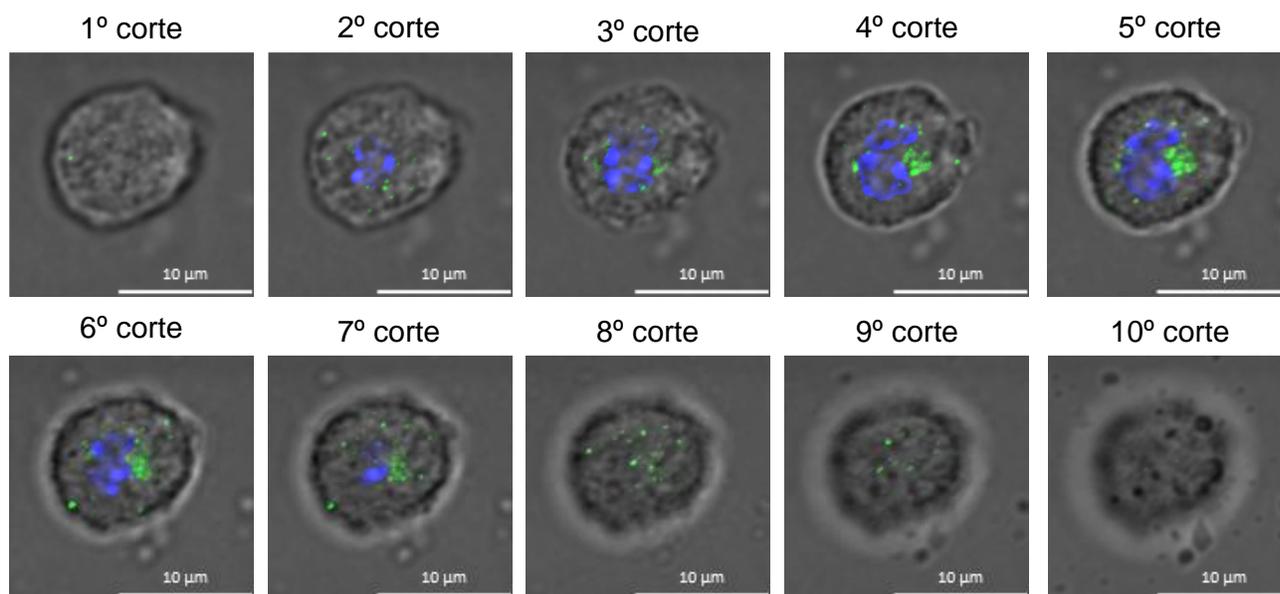
El coeficiente de Manders muestra que hay una colocación del receptor  $\mu$  con Rab 11 desde condiciones basales (figura 26). La morfina no altera la colocación del receptor  $\mu$  con Rab 11. Sin embargo, el fentanilo aumenta significativamente la localización del receptor  $\mu$  en endosomas de reciclamiento tardío después de los 2.5 min de estimulación.



**Figura 26: Coeficiente de Manders de la colocación entre el receptor  $\mu$  y Rab 11:** Las barras representan el promedio de 27 células  $\pm$  E.E. Prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba Dunnett \* $p < 0.05$  con respecto al control.

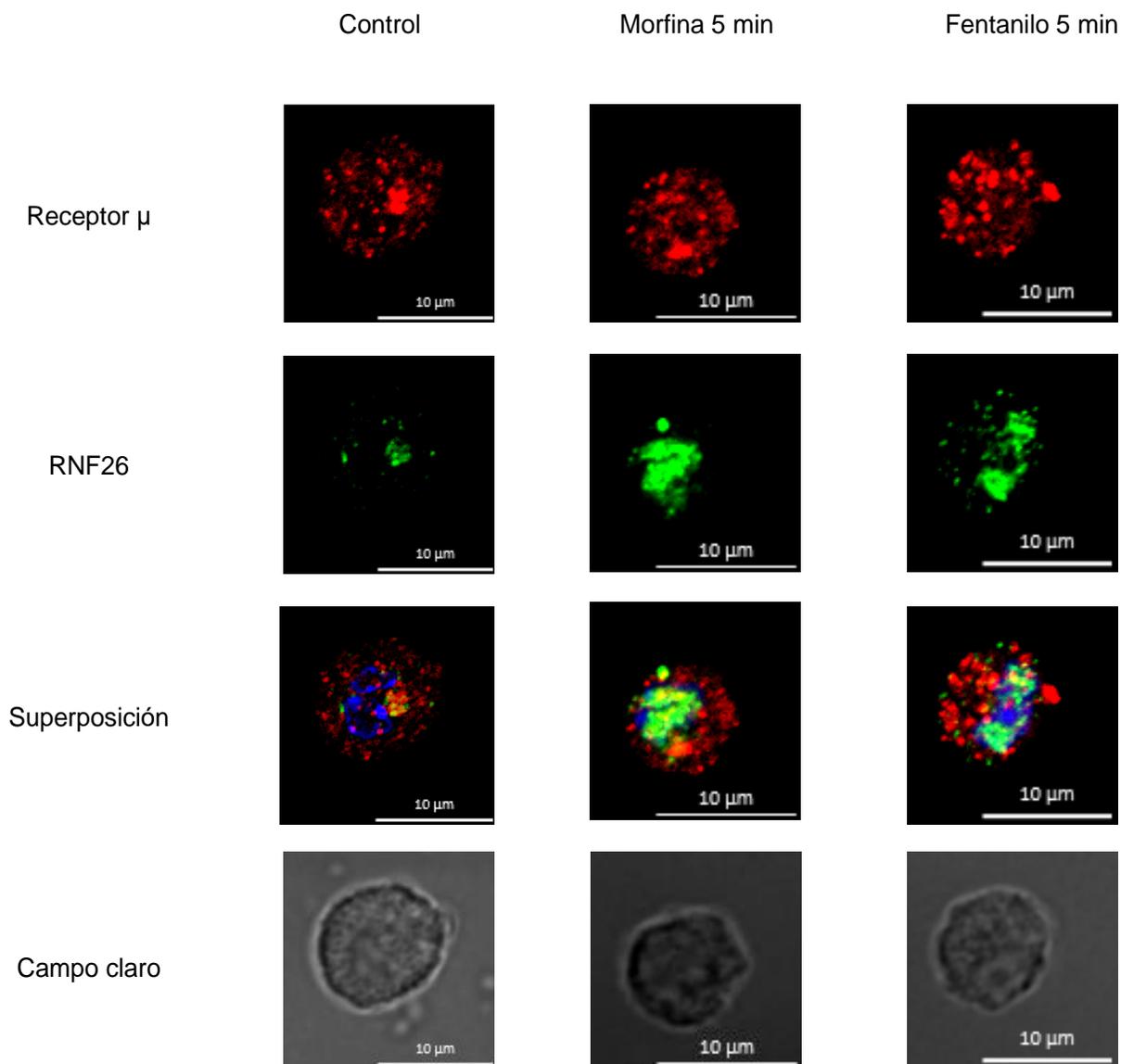
### 6.1.6 La morfina y el fentanilo inducen el tráfico vesicular del receptor $\mu$ por la nube perinuclear.

La nube perinuclear se identificó inicialmente con la proteína RNF26 (figura 27). La nube perinuclear (en verde) aparece normalmente en los mismos cortes en los que se observa el núcleo (en azul del segundo al séptimo corte, en el eje z) y desaparece dos cortes después de desaparecer el núcleo.



**Figura 27: Imágenes representativas de la nube perinuclear en BMMCs:** En azul se observa el núcleo y en verde a la proteína RNF26. Cada corte es la superposición de las marcas del núcleo, de la proteína RNF26 y el campo claro.

En condiciones basales el receptor  $\mu$  (en rojo) está distribuido en el citoplasma de las BMMCs y la proteína RNF26 (en verde), cerca del núcleo. La estimulación con morfina y con fentanilo (figura 28) aumenta la colocalización de ambas proteínas.



**Figura 28. Imágenes representativas de la ubicación del receptor  $\mu$  en la nube perinuclear en BMMCs estimuladas con morfina o fentanilo.** Se muestra una célula representativa de un total de 27. En rojo se observa el receptor  $\mu$ , en verde, la proteína RNF26 y en azul, el núcleo. El amarillo indica colocalización del receptor  $\mu$  y la proteína RNF26. También se muestran imágenes en campo claro de las células.

El coeficiente de Manders (figura 29) entre el receptor  $\mu$  y RNF26 (nube perinuclear) es de 0.5 en condiciones basales y aumenta ligera pero significativamente después de estimular a las células con morfina y fentanilo por 5 min.

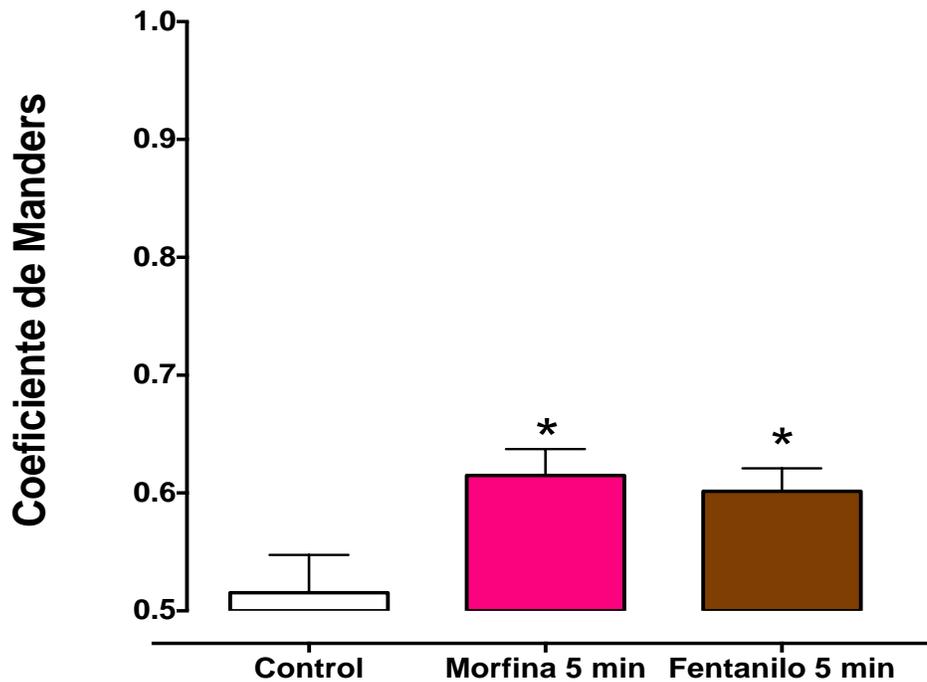
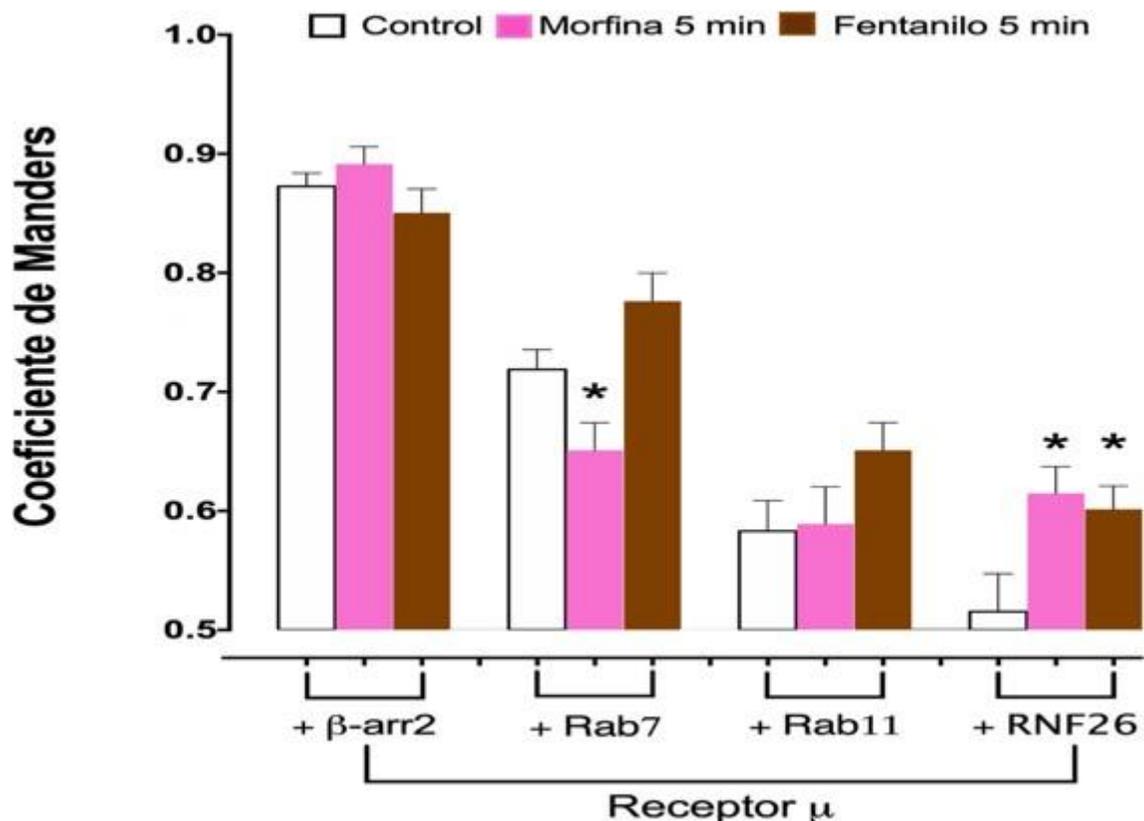


Figura 29. Coeficiente de Manders de la colocalización entre el receptor  $\mu$  y RNF26 en respuesta a con los estímulos de morfina y fentanilo: Las barras representan el promedio de 27 células  $\pm$  E.E. Orueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba Dunnett \* $p < 0.05$  con respecto al control.

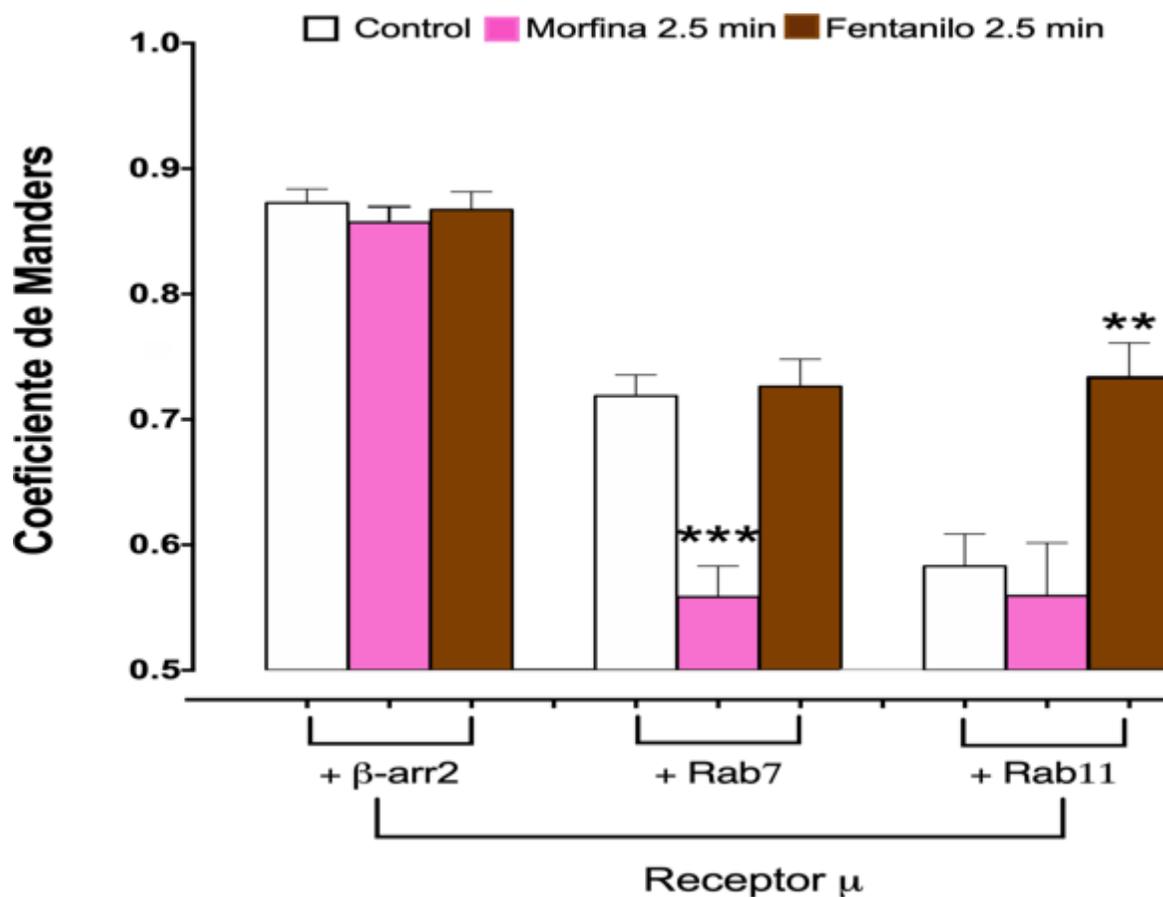
Para facilitar la interpretación de cómo es el tráfico vesicular del receptor  $\mu$  después de la estimulación con morfina o fentanilo, los resultados obtenidos se resumen en las figuras 30 y 31.

Los datos obtenidos después de cinco minutos de estimulación muestran que: 1) ningún tratamiento altera el grado de colocación del receptor  $\mu$  con la  $\beta$ -arr2 activa; 2) la morfina disminuye significativamente la colocación del receptor  $\mu$  con Rab7 y el fentanilo no tiene efecto en la localización del receptor  $\mu$  en endosomas tardíos; 3) ningún tratamiento modifica la asociación del receptor  $\mu$  con Rab11, por lo que ni la morfina ni el fentanilo llevan al receptor a endosomas de reciclamiento lento a los 5 min de estimulación; y 4) tanto la morfina como el fentanilo aumentan el tráfico vesicular del receptor hacia la zona perinuclear.



**Figura 30. Coeficiente de Manders de la colocación del receptor  $\mu$  con todas las proteínas analizadas en respuesta a los estímulos con morfina y con fentanilo por 5 min.** Las barras representan el promedio de 27 células  $\pm$  E.E. Prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba Dunnett \* $p < 0.05$  con respecto al control.

Los datos obtenidos después de 2.5 minutos de estimulación muestran más claramente las diferencias entre morfina y fentanilo del tráfico vesicular del receptor  $\mu$ . La colocalización entre el receptor  $\mu$  y  $\beta$ -arr2 activa se mantiene con los estímulos de morfina y de fentanilo. La localización del receptor  $\mu$  en endosomas tardíos (Rab 7) disminuye significativamente con la estimulación de morfina por 2.5 min, pero fentanilo no afecta esta localización. La colocalización del receptor  $\mu$  con Rab 11 aumenta con el estímulo de fentanilo por 2.5 min y con morfina se mantiene igual que en el control.

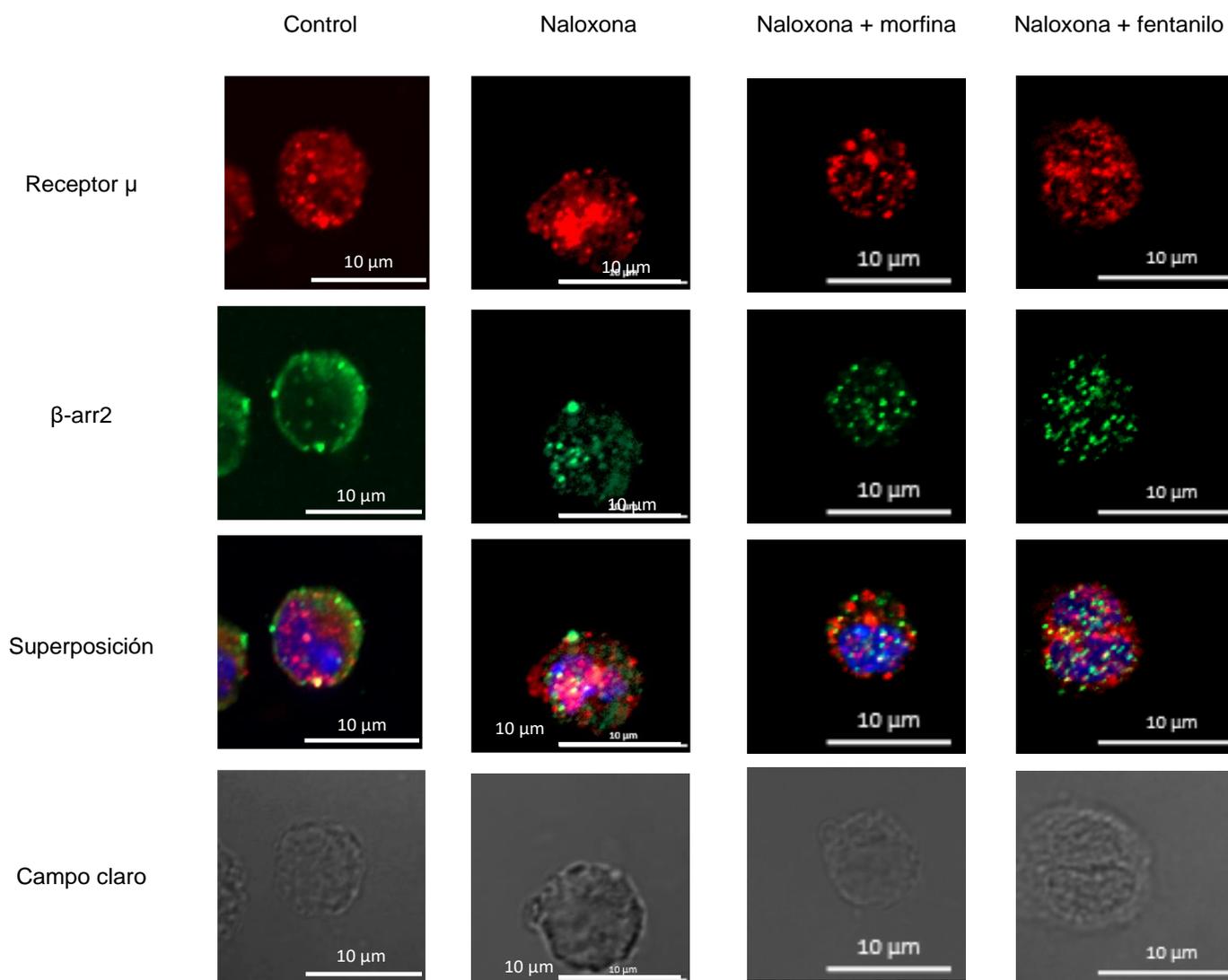


**Figura 31: Coeficiente de Manders de las colocalizaciones del receptor  $\mu$  y todas la proteínas analizadas con los estímulos de morfina y fentanilo por 2.5 min:** Las barras representan el promedio de 27 células  $\pm$  el E.E. Prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba Dunnett \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 con respecto al control.

## **6. 2 Determinación de la participación del receptor TLR4 en los efectos observados con la morfina y con el fentanilo.**

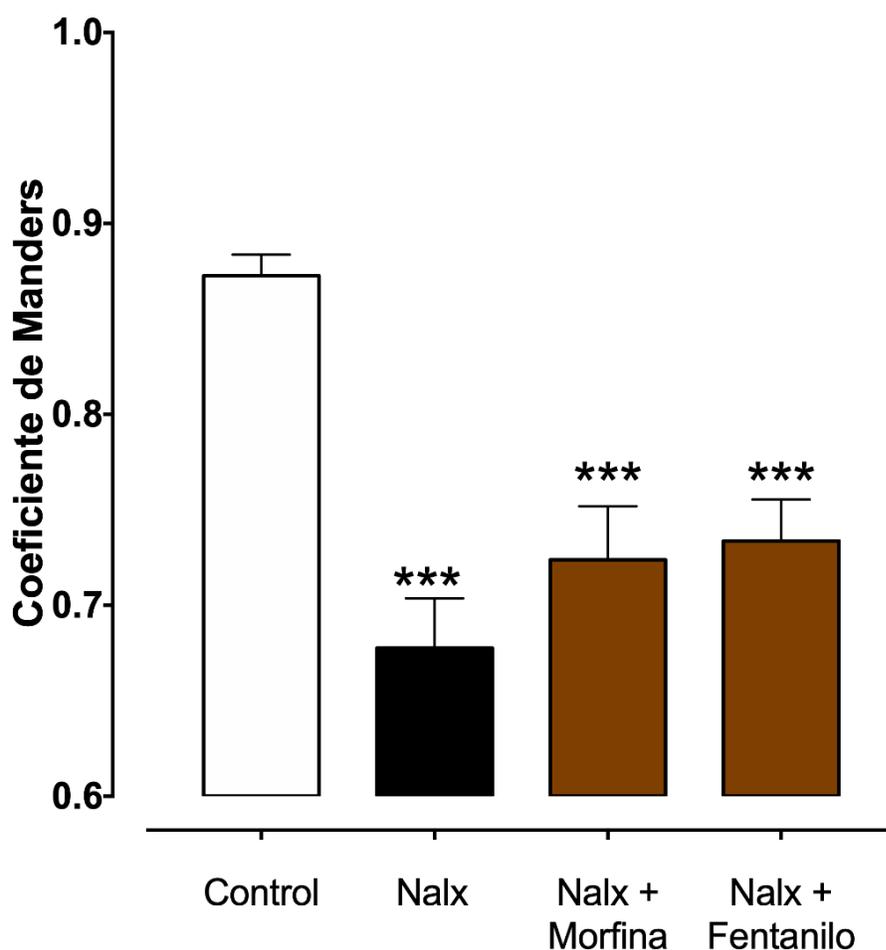
Como se mencionó en la introducción, no se sabe si el TLR4 influye en los efectos de la morfina y el fentanilo sobre el tráfico vesicular del receptor  $\mu$  en BMMCs. Para determinar su participación, estimulamos a las BMMCs con el antagonista competitivo no selectivo de los receptores opioides (-)-naloxona 5 min antes de los tratamientos con morfina o fentanilo. Ya que la (-)-naloxona no se une al TLR4.

En la figura 32 se observan las imágenes representativas de los efectos de la estimulación con naloxona sola, y con naloxona más morfina o fentanilo. Al administrar solamente naloxona se visualiza al receptor  $\mu$  cercano al núcleo y a la  $\beta$ -arr2 en el citoplasma, Estas dos proteínas no tienen una colocalización tan marcada respecto a las condiciones basales. La independencia entre el receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 se mantiene cuando las células se estimulan a con morfina o fentanilo después de administrar el antagonista.



**Figura 32. Imágenes representativas de BMMCs estimuladas con (-)-naloxona por 5 min y posteriormente con morfina o fentanilo por 5 min más.** Se muestra a una célula representativa de un total de 27. En rojo, se encuentra el receptor  $\mu$ , en verde, la  $\beta$ -arr2 y en azul, el núcleo. El amarillo indica colocalización. También se muestran imágenes de campo claro de las células.

El coeficiente de Manders muestra que la naloxona, por sí misma, disminuye significativamente la colocación del receptor  $\mu$  con la  $\beta$ -arr2 activa, en comparación con las células control (figura 33). La estimulación con la morfina o con el fentanilo después de la (-)-naloxona no contrarestró esta disminución.



**Figura 33. Coeficiente de Manders de la colocación entre el receptor  $\mu$  y  $\beta$ -arr-2 con la estimulación de naloxona previo a los estímulos con morfina o fentanilo.** El control corresponde a las condiciones basales. La estimulación con naloxona se realizó por 5 min. La estimulación con morfina o fentanilo fue por 5 min. Las barras representan el promedio de 27 células  $\pm$  E.E. Prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba Dunnett \*\*\* $p < 0.001$  con respecto al control.

## 7. Discusión

En este trabajo se analizaron las diferencias en el tráfico vesicular del receptor  $\mu$  opioide en BMMCs estimuladas con morfina o con fentanilo. Se estudió la localización del receptor  $\mu$  en endosomas tardíos, endosomas de reciclamiento lento y nube perinuclear. También se investigó si el receptor TLR4 influye en el tráfico intracelular del receptor  $\mu$ .

Los principales resultados de esta investigación son los siguientes: a) en BMMCs la mayor parte del receptor  $\mu$  se encuentra internalizado y asociado a  $\beta$ -arr2 activa en condiciones basales; b) el fentanilo aumenta la activación de la  $\beta$ -arr2 y su asociación al receptor  $\mu$  de forma muy rápida, mientras que la morfina requiere más tiempo para inducir el mismo efecto; c) una proporción importante de receptores  $\mu$  se localiza en endosomas tardíos, endosomas de reciclamiento lento y anclados a la nube perinuclear en condiciones basales; d) el fentanilo induce el tráfico del receptor  $\mu$  hacia endosomas de reciclamiento lento; e) la morfina y el fentanilo aumentan el anclaje del receptor  $\mu$  a la nube perinuclear; f) el TLR4 no tiene influencia en el tráfico intracelular del receptor  $\mu$  estimulado con morfina o con fentanilo; g) la naloxona disminuye notablemente la asociación entre el receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2.

El primer resultado obtenido en este trabajo fue que, en condiciones basales, la mayor parte del receptor  $\mu$  se encuentra localizado en el interior de las BMMCs. Debido a que las CC tienen un movimiento exocítico y endocítico importante y constante al secretar mediadores inflamatorios y posteriormente endocitar la membrana para mantener su tamaño adecuado, se puede pensar que parte de los receptores se encuentren en vesículas o en la nube perinuclear. Sin embargo, esta localización intracelular no había sido reportada en BMMCs. Otros reportes han demostrado que, en otros tipos celulares (como células de neuroblastoma y células embrionarias de riñón humano), el receptor  $\mu$  puede estar internalizado y que la estimulación con opioides genera su tráfico hacia la membrana plasmática con ayuda de proteínas chaperonas llamadas RTP4 (Fujita *et al.*, 2019; De´Caillot *et al.*, 2008).

Además de lo anterior, existe evidencia que demuestra que las balsas lipídicas le confieren estabilidad al receptor  $\mu$  (Suzuki *et al.*, 2005; Daumas *et al.*, 2003) lo cual podría explicar la compartimentalización del receptor  $\mu$  en sitios intracelulares como las vesículas (Ikonen 2001; Simons & Van Meer 1988). Por otro lado, el receptor  $\mu$  no es el único GPCR que se ha encontrado dentro de las BMMCs, ya que el receptor a endocannabinoides CB<sub>2</sub> también se encuentra internalizado y señala intracelularmente (Espinosa-Riquer *et al.*, 2019; Brailoiu *et al.*, 2014).

Con respecto a la elevada asociación del receptor  $\mu$  con la  $\beta$ -arr2 activa, esto podría deberse a que el receptor  $\mu$  se encuentra activo dentro de las CCs y que la  $\beta$ -arr2 esté regulando esta actividad. Las CCs poseen la maquinaria para sintetizar opioides y secretarlos, por lo que podrían, de forma autócrina, estar siendo estimuladas por niveles bajos de opioides en condiciones basales. En apoyo a esta idea hay un reporte de que las CCs pueden producir alpha-endorfina (Zverkov *et al.*, 1984). Por otra parte, se ha mostrado que el receptor  $\mu$  presenta actividad basal ligera en células renales de embrión humano (HEK-293) y en células epiteliales de rata (células GH3); y en estados de abstinencia se ha observado que el receptor  $\mu$  tiene una actividad basal elevada debido a los cambios que sufre la célula por el tiempo prolongado que estuvo expuesto a los opioides (Cruz *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2001; Burford *et al.*, 2000; Katritch *et al.*, 2014; Willians *et al.* 2013). En conjunto, estos datos sugieren que el receptor  $\mu$  podría estar activo por la presencia de opioides en las BMMCs, estar constitutivamente activos, o las dos cosas.

Otra explicación de la alta colocalización observada entre el receptor  $\mu$  y la  $\beta$ -arr2 activa en condiciones basales es que podría deberse a las condiciones experimentales empleadas en este estudio. Las BMMCs se sensibilizan por 24 h con IgE con la finalidad de tener una célula con mediadores inflamatorios preformados y con toda la maquinaria preparada para responder frente a cualquier estímulo. Esta sensibilización podría estar activando a la  $\beta$ -arr2, ya que se ha reportado que esta proteína regula la señalización del receptor Fc $\epsilon$ RI (al que se une la IgE) (Roy *et al.*, 2019). Además de ser importante en la señalización del

receptor de la IgE, la  $\beta$ -arr2 también participa en el sistema de señalización del receptor TLR4 presente en estas células (Madera-Salcedo, *et al.* 2013).

Cuando se analizó el efecto de la morfina en la unión del receptor  $\mu$  a la  $\beta$ -arr2 activa, se encontró que este opioide aumenta la colocalización de ambas proteínas al igual que el porcentaje de  $\beta$ -arr2 activa a tiempos largos de estimulación (10 min). Existen algunas investigaciones en donde se ha observado que la morfina promueve la unión del receptor  $\mu$  con la  $\beta$ -arr2 ( Koch *et al.*, 2001; Bohn *et al.*, 2000; Vu *et al.*, 2011), pero esta unión es poco estable y tarda en producirse debido a que el cambio conformacional que induce la morfina sobre el receptor  $\mu$  expone sitios de fosforilación diferentes a los expuestos por otros agonistas opioides sesgados hacia la vía de  $\beta$ -arr2 (Molinari *et al.*, 2010; McPherson *et al.*, 2010). Además, el receptor  $\mu$  puede formar dímeros con el receptor  $\delta$  en respuesta a la morfina (Fujita *et al.*, 2019), lo cual puede modificar la fuerza y estabilidad de unión del receptor  $\mu$  con la  $\beta$ -arr2 (Molinari *et al.*, 2010; De´Caillot *et al.*, 2008).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que el fentanilo genera un aumento de la unión del receptor  $\mu$  con la  $\beta$ -arr2 activa y un aumento del porcentaje de la  $\beta$ -arr2 activa a tiempos muy cortos. Esto podría deberse a que el fentanilo es una agonista sesgado hacia la vía de las  $\beta$ -arrestinas. Cuando el fentanilo se une al receptor  $\mu$  se genera un cambio conformacional que, además de activar a la proteína  $G_i$ , expone sitios de fosforilación en Ser 370, Ser 375 y Thr180. Este cambio confiere una mayor estabilidad para la unión de  $\beta$ -arr2 y disminuye el tiempo que tarda en unirse esta proteína al receptor. Además, se ha observado que el fentanilo activa en segundos a la  $\beta$ -arr2 en modelos *in vitro* (Molinari *et al.*, 2010; Willians *et al.* 2013). Esto concuerda con los resultados obtenidos con fentanilo en las células utilizadas en el presente estudio.

Debido a que los receptores  $\mu$  se encontraron dentro de la célula y los opioides utilizados son ligandos sesgados hacia distintas vías de señalización, se analizó la localización del receptor  $\mu$  en compartimentos intracelulares importantes para definir el destino final de muchas proteínas como la nube perinuclear. Este compartimento es una región en la que se clasifican las proteínas que van a ser transportadas a la membrana plasmática, las que serán degradadas en lisosomas y las que van a mantenerse ancladas en el RE hasta que las células las necesiten. La arquitectura de la nube perinuclear depende, principalmente, de la proteína RNF26, pero también requiere de la participación de las proteínas chaperonas de las vesículas como las GTPasas Rabs.

En los resultados del presente trabajo, se demostró que en condiciones basales, los receptores  $\mu$  colocalizan con la proteína Rab7. Esto puede explicarse porque Rab7 no sólo media el transporte de receptores a los lisosomas, sino que también puede contribuir al paso de proteínas a la red trans-Golgi y a la nube perinuclear, así como a transportar proteínas desde el centro de organización de microtúbulos a la membrana plasmática de las BMMCs (Lombardi *et al.*, 1993; Seachrist *et al.*, 2003; Neefjes *et al.*, 2017). Esto indica que aún en ausencia de estímulo, el receptor  $\mu$  tiene un tráfico vesicular importante que podría contribuir a la señalización desde el interior de la célula.

Al estimular a las células con morfina se observó una disminución de la colocalización del receptor  $\mu$  con la proteína Rab 7, mientras que con el fentanilo no se observaron cambios en la colocalización. Esto indica que el movimiento del receptor  $\mu$  a los endosomas tardíos no es el tráfico preferencial después de que el receptor es activado, lo que puede indicar que el receptor no irá a la vía de degradación; sin embargo, sería importante analizar la colocalización de éste con marcadores de lisosomas como LAMP-1 o LAMP-2 (Huynh *et al.*, 2007) para poder corroborarlo. Vale la pena mencionar que se ha demostrado que algunos GPCRs que se localizan en lisosomas (Espinosa-Riquer, *et al.*, 2019) pueden seguir señalizando (Rozenfeld 2011, Zou y Kumar 2018; Brailoiu, 2015), sin embargo, hasta el momento no se sabe si este es el caso para los receptores a opioides.

En nuestro trabajo también se observó que en condiciones basales existe una colocalización del receptor con Rab 11 y RNF26, la estimulación con morfina no genera un cambio en la colocalización del receptor  $\mu$  con Rab11 pero y que la estimulación morfina sí aumenta la asociación de este receptor con la proteína RNF26. Esto sugiere que la morfina no induce el reciclamiento del receptor  $\mu$  en vesículas positivas para Rab11.

Por otro lado, la estimulación con fentanilo aumenta la asociación del receptor  $\mu$  con Rab 11 y con la nube perinuclear, lo que hace suponer que este fármaco genera alguna señal que hace que el receptor  $\mu$  se dirija a la nube perinuclear y de ahí sea transportado a endosomas de reciclamiento tardío. Las células presentan un tráfico vesicular de proteínas clave para sus funciones; sin embargo, no está bien esclarecido cuáles son las señales específicas que generan los movimientos de las vesículas hacia compartimentos celulares o hacia la membrana plasmática (Seachrist *et al.*, 2003). Debido a que las CCs tienen un movimiento constante de vesículas y de transporte de membrana plasmática, habría que profundizar más en el estudio del tráfico vesicular en estas células (Lombardi *et al.*, 1993; Seachrist *et al.*, 2003; Neefjes *et al.*, 2017; Magalhaes *et al.*, 2011).

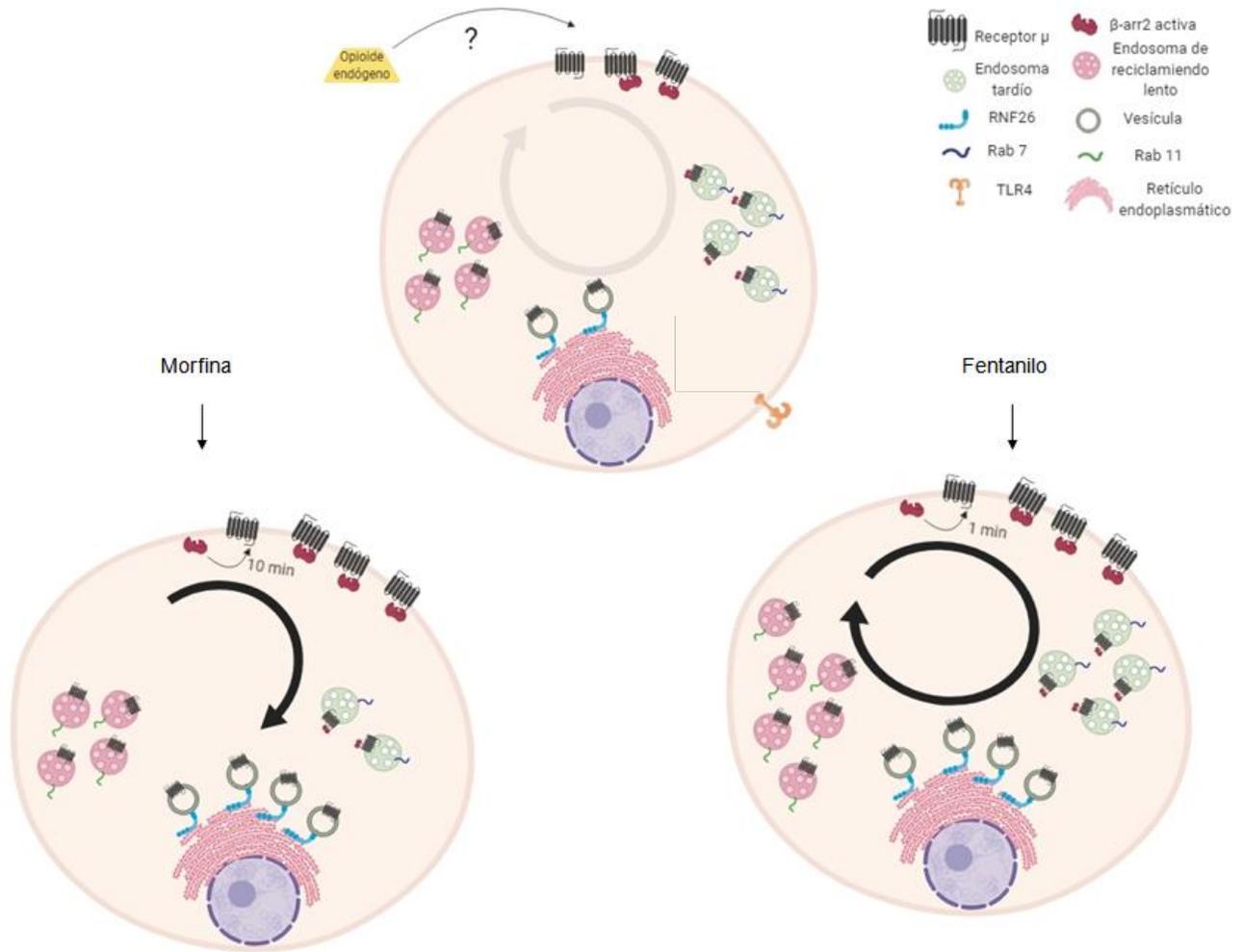
Como se mencionó en la introducción, los fármacos opioides pueden unirse al receptor TLR4. Para determinar si este receptor participaba o no en los efectos inducidos por la morfina o por el fentanil, se analizó la asociación del receptor  $\mu$  con la  $\beta$ -arr2 activa en presencia de la (-)-naloxona. Este antagonista bloquea a los receptores opioides y no al TLR4 (Hutchinson *et al.*, 2010). Los resultados mostraron que la (-)-naloxona disminuye significativamente la unión del receptor  $\mu$  a la  $\beta$ -arr2 al compararlo con lo observado en condiciones basales. Por lo que la respuesta está mediada por el receptor  $\mu$ . Otra posible explicación de los efectos observados por la (-)-naloxona es que se ha descrito que la naloxona puede tener actividad de agonismo inverso en los receptores opioides y que su unión genera un cambio conformacional del receptor  $\mu$  que lleva un estado de nula actividad (Cruz *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2005; Katritch *et al.*, 2014; Willians *et al.* 2013; Divin *et al.*, 2009).

Al estimular a las BMBCs con morfina o con fentanilo después de la incubación con naloxona, los agonistas no tuvieron efecto sobre el receptor  $\mu$ , lo que significa que los cambios en el tráfico vesicular están mediados por el receptor  $\mu$  opioide.

Los principales hallazgos de este trabajo pueden verse en la figura 34. En ella se describe que el receptor  $\mu$  se encuentra dentro de las CCs y podría estar activado por acción de opioides endógenos. Al estar activo, el receptor regula su actividad por la  $\beta$ -arr2 (esta proteína también señala por la vía de las MAPK).

La interacción del receptor  $\mu$  con  $\beta$ -arr2 aumenta con los estímulos de morfina y fentanilo. La administración de (-)-naloxona previó a la estimulación con morfina o con fentanilo nos permitió saber que las acciones están moduladas por el receptor  $\mu$  y no por el TLR4. El receptor  $\mu$  tiene un tráfico vesicular activo por endosomas tardíos (ETD) marcados con Rab 7, por endosomas de reciclamiento lento (ERL) marcados con Rab 11 y por la nube perinuclear posiblemente por el movimiento membranal que presentan estas células al tener una constante segregación de vesículas. Asimismo, la morfina disminuye el tráfico del receptor  $\mu$  por los ETD y el fentanilo aumenta su tráfico por los ERL. Además ambos fármacos aumentan la asociación del receptor  $\mu$  a la nube perinuclear. Sin embargo, falta saber si la morfina y el fentanilo llevan al receptor  $\mu$  a la degradación en los lisosomas.

Existen diversos estudios acerca del papel que juegan los opioides en las CCs y cómo estos fármacos inhiben la secreción de mediadores inflamatorios y el papel que juegan en las alergias. Sin embargo, las respuestas que inducen los diferentes ligandos opioides no han sido completamente descritas. Hay que profundizar más, no sólo en el mecanismo de acción de los receptores opioides, sino en el tráfico vesicular de los receptores en diferentes células del SI y también en el estudio de las CCs y como los diferentes fármacos pueden influir en la señalización celular y la respuesta inmune que presentan. Además, es importante conocer los mecanismos que subyacen a la actividad de la  $\beta$ -arr2 para controlar las alergias y la secreción de mediadores inflamatorios, debido a que estas células se encuentran en tejidos conectivos, órganos y piel mediando la activación de la inmunidad adaptativa.



**Figura 34. Tráfico del receptor  $\mu$  generado por morfina y fentanilo en BMMCs.** A) En condiciones basales, el receptor  $\mu$  se encuentra en constante tráfico vesicular, pero la mayor parte está internalizado y unido a  $\beta$ -arr2 activa. Esto puede deberse a que opioides endógenos secretados por la misma célula estén activando a los receptores  $\mu$ . El receptor  $\mu$  se encuentra en endosomas tardíos (marcados con Rab 7), en la nube perinuclear (marcada con RNF26) y en endosomas de reciclamiento lento (marcados con Rab 11). El receptor TLR4 participa en el tráfico vesicular del receptor  $\mu$ . B) La morfina aumenta la asociación del receptor  $\mu$  con  $\beta$ -arr2 activa a tiempos largos (10 min), disminuye su tráfico por endosomas tardíos, aumenta la cantidad de receptor  $\mu$  localizado en la nube perinuclear y no modifica el tráfico de este receptor por endosomas de reciclamiento lento. C) El fentanilo también aumenta la asociación del receptor  $\mu$  con la  $\beta$ -arr2 activa a tiempos más cortos (1 min), no modifica el tráfico del receptor  $\mu$  en endosomas tardíos, pero sí aumenta su localización en la nube perinuclear, así como en endosomas de reciclamiento lento.

## 8. Conclusiones

En BMMCs el receptor  $\mu$  opioide se encuentra internalizado y colocalizando con la  $\beta$ -arr2 activa. También este receptor presenta un constante tráfico vesicular en condiciones basales.

La morfina y el fentanilo difieren en el tráfico vesicular del receptor  $\mu$ . La morfina aumenta la colocalización del receptor  $\mu$  con  $\beta$ -arr2, y el porcentaje de área celular de la  $\beta$ -arr2 activa sola a tiempos más prolongados que el fentanilo y también disminuye el tráfico vesicular del receptor  $\mu$  por endosomas tardíos. Por su parte el fentanilo aumenta la colocalización del receptor  $\mu$  con  $\beta$ -arr2, y el porcentaje de área celular de la  $\beta$ -arr2 activa sola desde el primer minuto y también incrementa el número de receptores  $\mu$  en endosomas de reciclamiento lento.

En estado basal las BMMCs, muestran una cierta proporción del receptor  $\mu$  en la nube perinuclear. La morfina y el fentanilo aumentan el tráfico vesicular del receptor  $\mu$  hacia la nube perinuclear.

En BMMCs, la naloxona actúa como un agonista inverso del receptor  $\mu$  al disminuir su colocalización con la  $\beta$ -arr-2, lo que impide la señalización por esta vía. También este antagonista impide la activación del receptor  $\mu$  por la morfina y por el fentanilo.

El TLR4 no tiene influencia sobre el tráfico vesicular del receptor  $\mu$ , estimulado por morfina o fentanilo.

## 9. Perspectivas

1. Debido a que en este trabajo se observó que la mayor parte del receptor  $\mu$  se encontraba internalizado en las BMMCs, sería importante conocer si el receptor  $\mu$  se encuentra señalizando dentro de las células por la vía de las proteínas G, con un ensayo de activación de la AC.
2. Es necesario determinar la cantidad de la  $\beta$ -arr2 total, no sólo la activa, en la célula para comparar la cantidad de esta proteína que se está uniendo al receptor. Esto podría realizarse con una inmunohistoquímica, marcando a la  $\beta$ -arr2 total y comparandola con la  $\beta$ -arr2 activa.
3. También convendría comprobar la señalización del receptor  $\mu$  por la vía de la  $\beta$ -arr2, y cómo cambia con la administración de morfina y fentanilo a través de una co- inmunoprecipitación, un ensayo de complementación de fragmentos de proteínas (PCA) o mediante transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET).
4. Otro experimento a realizar sería evaluar si las CCs están produciendo opioides endógenos que mantienen al receptor  $\mu$  activo mediante una Elisa contra endorfinas.
5. Analizar la formación de dímeros entre el receptor  $\mu$  y el receptor  $\delta$  para saber si es el receptor  $\mu$  o el receptor  $\delta$  al cual está unido la  $\beta$ -arr2, mediante el ensayo de ligando de proximidad (PLA).
6. Observar qué pasa con el tráfico del receptor  $\mu$  con estímulos crónicos de morfina y fentanilo. Mediante RT-PCR observar si aumenta o disminuye la síntesis de estas dos proteínas.
7. Mediante siRNAs disminuir la expresión de  $\beta$ -arr-2 y observar la secreción de  $\beta$ -hexosaminidasa en BMMCs, con la final de ver la participación en la respuesta alérgica.
8. Comprobar qué pasa con la influencia del receptor TLR4 en el tráfico vesicular mediante la estimulación con (+)-naloxona, para saber si el TLR4 no tiene una influencia en el receptor  $\mu$

## 10. Referencias bibliográficas

- Bai L, Zhai C, Han K, Li Z, Qian J, Jing Y, Zhang W, Xu J. Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor- $\kappa$ B activation in spinal cord contributes to chronic morphine-induced analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neurosci Bull.* 2014; 30(6):936–948.
- Bahoutha S., Nooh M. Barcoding of GPCR trafficking and signaling through the various trafficking roadmaps by compartmentalized signaling networks. *Cellular signalling.* 2017; 36: 42-55.
- Belcheva M, Coscia C. Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals* 2002; 11(1): 34-44.
- Benyhe S, Zádor F, Ötvös F. Biochemistry of opioid (morphine) receptors: binding, structure and molecular modeling. *Acta biologica Szegediensis.* 2014; 59(1): 17-37.
- Bohn L., Gainetdinov R., Lin F., Lefkowitz R., Caron M.  $\mu$ -Opioid receptor desensitization by  $\beta$ -arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Letters to nature.* 2000; 408: 720-723.
- Bohn L., Lefkowitz R., Gainetdinov R., Peppel K., Caron M., Source F. Enhanced Morphine Analgesia in Mice Lacking  $\beta$ -Arrestin 2. *Science.* 1999; 285(5449): 2495-2498.
- Börner C., Lanciotti S., Koch T., Hölt V., Jürgen K. Mu opioid receptor agonist-selective regulation of interleukin-4 in T lymphocytes. *Journal of neuroimmunology.* 2013; 263: 35-42.
- Burford N., Wang D., Sadée W. G-protein coupling of  $\mu$ -opioid receptors (OP3): elevated basal signalling activity. *Biochemical journal.* 2000; 348: 531-537.
- Burwen S., Recycling of mast cell following degranulation in vitro: an ultrastructural estudy. *Tissue Cell.* 1982; 14: 854-865.
- Busse, G. Drugs. The straight facts.Morphine. Editorial: Chelsea house publishers. 2006.
- Brailoiu C., Deliu E., Marcu J., Hoftman N., Console-Bram L., Zhao P., Madesh M., Abood M., Braloiu E. Differential Activation of Intracellular versus Plasmalemmal CB2 Cannabinoid Receptors. *Biochemistry.* 2014; 53: 4990-4999.
- Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Googman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Editorial Tha MacGraw-Hill. 12ª edición. 2012; 41-71.
- Calebio D., Nikolaev V., Persani L., Lohse M. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Cell Press.* 2010; 31(5): 221-228.
- Carr D., Baker M., Holmes C., Brockunier L., Bagley J., France C. OHM3295: a fentanyl-related 4-heteroanilido piperidine with analgesic effects but not suppressive effects on splenic nk activity in mice *Immunopharmacology.* 1994; 16(10): 835-844.
- Chen V, Mestek A, Liu J, Hurley J, Vu L. Molecular Cloning and Functional Expression of a  $\mu$ -Opioid Receptor from Rat Brain. *Molecular pharmacology.* 1993; 44:8-12.
- Chrétien M., Benjannet S., Gossard F., Gionoulakis C., Lis M., Seidah. From beta-lipotropin to beta-endorphin and 'propio-melanocortin'. *Canadian Journal of biochemistry.* 1979; 57 (9): 1111-1121.

- Costa T., Cotecchia. Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein- coupled receptors. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2005; 26(12): 618-624.
- Cox B, Christie M, Devi L, Toll L, Traynor J. Challenges for opioide receptor nomenclature: IUPHAR reviem 9. *British journal of pharmacology*. 2015: 172; 317-323.
- Cruz S, Granados V. *Neuroscience in the 21st Century. Chapter Opioids and opiates: pharmacology, abuse and addiction*. Springer Science. 2015: 1-32.
- Cruz SL., Villarreal J., Volkow N. Further evidence that naloxone acts as an inverse opiate agonist: implications for drug dependence and withdrawal. *Pharmacology letters*. 1996: 58(26); 381-389.
- Darcq E, Kieffer B. Opioid receptors: drivers to addiction? *Nature Reviews*. 2018: 19(8); 499-514.
- Dumas F., Destainville N., Millot C., López A., DEan D., Salome L. Confined Diffusion Without Fences of a G-Protein-Coupled Receptor as Revealed by Single Particle Tracking. *Biophysical Journal*. 2003: 84; 356–366.
- De Gregori S, De Gregori M, Ranzani G, Allegri M, Minella C, Regazzi M. Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metabolic Brain Disease*. 2012: 27; 1-5.
- De´caillot F., Rozenfeld R., Gupta A., Devi L. Cell surface targeting of - opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105(41): 16045–16050.
- Dellibovi T, Altan N. Cloud storage for endosomes. *The EMBO journal*. 2016: 16; 1724-1725.
- Delom F, Fessart D. Role of phosphorylation in the control of clathrin-mediated internalization of GPCR. *International Journal of the Cell Biology* 2011: Article ID 246954.
- Divin M., Bradbury F., Carroll F. Traynor J. Neutral antagonist activity of naltrexone and 6b-naltrexol in naïve and opioid-dependent C6 cells expressing a m-opioid receptor. *British Journal of Pharmacology*. 2009; 156: 1044–1053.
- Dunn K., Kamocka M., McDnald J. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Journal of physiology cell*. 2011; 300: 723-742.
- Espinosa-Riquer Z., Ibarra-S´anchez A., Vidhushan S., Bratti M., Charles N., Ulrich B., Rodríguez-Manzo G., González-Espinosa C. TLR4 Receptor Induces 2-AG–Dependent Tolerance to Lipopolysaccharide and Trafficking of CB2 Receptor in Mast Cells. *The journal of immunology*. 2019; 202: 1-12.
- Franchi S., Panerai A., Sacerdote P. Buprenorphine ameliorates the effect of surgery on hypothalamus–pituitary–adrenal axis, natural killer cell activity and metastatic colonization in rats in comparison with morphine or fentanyl treatment. 2007; 21: 767-774.
- Fredriksson R, Lagerstrom M, Lundin L, Schi Oth H. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Molecular pharmacology*. 2003; 63(6): 1256-1272.
- Fujita W., Yokote M., Gomes I., Guota A., Ueda H., Devi L. Regulation of an Opioid Receptor Chaperone Protein, RTP4, by Morphine. *Molecular pharmacology*. 2019; 95: 11-19.

- Gentek R., Ghigo C., Hoeffel G., Bulle M., Msallam R., Gautier G., Launay P., Chen J., Ginhoux F., Bajeñoff M. Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. *Immunity*. 2018; 48; 1160-1171.
- Gilman A. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual review of biochemistry*. 1987; 56; 615-649.
- Hanyaloglu A., Zastrow M. Regulation of GPCRs by Endocytic Membrane Trafficking and Its Potential Implications. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2008; 48: 537-568.
- Hilger D., Masureel M., Kobilka B. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2018; 25: 4-12.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *The American Association of Immunologists*. 1999: 3749-3752.
- Huang, W., Manglik, A., Venkatakrisnan, A. J., Laeremans, T., Feinberg, E. N., Sanborn, A. Structural insights into  $\mu$ -opioid receptor activation. *Nature*. 2015: 524(7565); 315–321.
- Huynh K., Eskelinen E., Scott C., Malevanets A., Safting P., Gristein S. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO journal*. 2007; 26(2): 313-324.
- Ikonen E. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Current opinion in cell biology*. 2001: 13; 470-477.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*. 2004; 5(10): 987-995.
- Jimenez I, Igléssias T, Fuentes A. Stereoselectivity and subtype of the opiate receptor involved in stress-induced hypertension. *European Journal of pharmacology* 1990; 182: 155-160.
- Jongsma LM, Berlin I, Wijdeven HM, Van Veelen AP, Spaapen MR, Neefjes J. An ER-associated pathway defines endosomal architecture for controlled cargo transport. *Cell press*. 2016; 166: 152-166.
- Katritch V., Fenalti G., Abola E., Roth B., Cherezov V., Stevens R. Allosteric sodium in class A GPCR signaling. *Cell press*. 2014; 39(5): 233-244.
- Koch T., Schulz S., Pfeiffer M., Klutzny M., Schröder H., Kahl E., Schöder H. C-terminal Splice Variants of the Mouse  $\mu$ -Opioid Receptor Differ in Morphine-induced Internalization and Receptor Resensitization. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2001; 276(33): 31408-31408-31414.
- Koehl A., Hu H., Maeda S., Zhang Y., Qu Q., Paggi J., Latorraca N., Hilger D., Dawson R., Matile H., Schertler G., Granier S., Weis W., Dror R., Manglik A., Skiniotis G., Kobilka B. Structure of the  $\mu$ -opioid receptor–Gi protein complex. *Nature*. 2018: 558; 547-552.

- Kolinski M., Filipek S. Studies of the Activation Steps Concurrent to Ligand Binding in  $\mu$ OR and  $\delta$ OR Opioid Receptors Based on Molecular Dynamics Simulations. *The Open Structural Biology Journal*. 2009; 3; 51-63.
- Kooover A., Celver J., Wu A., Chavkin C. Agonist Induced Homologous Desensitization of m-Opioid receptors Mediated by G Protein-Coupled Receptor Kinases is Dependent on agonist efficacy. *Molecular pharmacology*. 1998; 54:704–711.
- Koyyalagunta D. Pain Management. Chapter 113: Opioid analgesics. Elsevier. 2007; 939-964.
- Krystel-Whittemore M., Dileepan K., Wood J. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Frontiers immunology*. 2016; 6(620): 1-12.
- LaForge, K. S., Yuferov, V., Kreek, M. J. Opioid receptor and peptide gene polymorphisms: potential implications for addictions. *European Journal of Pharmacology*. 2015; 410(2-3): 249–268.
- Lee M., Mishra A., Lambright D. Structural Mechanisms for Regulation of Membrane Traffic by Rab GTPases. *Traffic*. 2009; 10: 1377-1389.
- Lefkowitz R., Rajagopal K., Whalen E. New Roles for  $\beta$ -Arrestins in Cell Signaling: Not Just for seven-Transmembrane Receptors. *Molecular cell*. 2006; 24: 643-652.
- Liang X., Liu R., Chen C., Ji., Fang., Li T., Opioid System Modulates the Immune Function: A Review. *Department of Health & human Service U.S*. 2016; 1(1): 5-13.
- Liu J., Ruckle M., Prather P. Constitutively Active  $\mu$ -Opioid Receptors Inhibit Adenylyl Cyclase Activity in Intact Cells and Activate G-proteins Differently Than the Agonist [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>]enkephalin. *Journal of biological chemistry*. 2001; 276(41): 37779-377786.
- Löttsch J, Walter C, Parnham M, Oertel B, Geisslinger G. Pharmacokinetics of non-intravenous formulations of fentanyl. *Clinical pharmacokinetics*. 2013; 52; 23-36.
- Lowe J., Sanderson H., Cooke A., Ostovar M., Tsisanova E., Withey S., Chavkin C., Husbands S., Kelly E., Henderson G., Bailey C. Role of G Protein-Coupled Receptor Kinases 2 and 3 in m-Opioid Receptor Desensitization and Internalization. *Molecular pharmacology*. 2015; 88; 347-356.
- Luttrell ML, Gesty-Palmer D. Beyond desensitization: Physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacological reviews*. 2010; 62(2): 305-562.
- MacKenzie M, Zed P, Ensom M. Opioid pharmacokinetics-pharmacodynamics: clinical implication in acute pain management in trauma. *Annals of pharmacotherapy*. 2016; 50 (3); 209-218.
- Madera-Salcedo I., Cruz S., Gonzalez-Espinosa C. Morphine decreases early peritoneal innate immunity responses in Swiss-Webster and C57BL6/J mice through the inhibition of mast cell TNF- $\alpha$  release. *Journal of neuroimmunology*. 2011; 232: 101-107.
- Madera-Salcedo I., Cruz S., Gonzalez-Espinosa C. Morphine Prevents Lipopolysaccharide-Induced TNF Secretion in Mast Cells Blocking I $\kappa$ B Kinase Activation and SNAP-23

Phosphorylation: Correlation with the Formation of a  $\beta$ -Arrestin/TRAF6 Complex. *Journal of neuroimmunology*. 2013; 191:3400-3409.

- Magalhaes A., Dunn H., Ferguson S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *British journal of pharmacology*. 2011; 165: 1717–1736.
- Manders E., Verbeekts F., Aten A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy*. 1993; 169(3): 375-382.
- Martin W. *Pharmacology of opioids*. 1984: 34 (4); 283-323.
- Matthes, H. W., Maldonado R., Simonin F., Valverde O., Slowe S., Kitchen I., Befort K., Dierich A., Le Meur M., Dollé P., Tzacara E., Hanoune J., Roques B., Kieffer B. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*. 1996: 383; 819–823.
- McPherson J., Rivero G., Baptist M., Llorente J., Al-Sabah S., Krasel C., Dewey W., Bailey C., Rosethorne E., Charlton S., Henderson G., Kelly E.  $\mu$ -Opioid Receptors: Correlation of Agonist Efficacy for Signalling with Ability to Activate Internalization. *Molecular pharmacology*. 2010; 78(4): 756-766.
- Medzhitov R, Preston HP, Janeway C. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Letters to nature*. 1997; 388: 394-397.
- Metcalfe D., Boyce J. Mast cell biology in evolution. *Journal allergy clinical immunology*. 2006; 117:1227-1229.
- Molinari P., Vezzi V., Sbraccia M., Gro`C., Riitano D., Ambrosio C., Casella I., Costa T. Morphine-like Opiates Selectively Antagonize Receptor-Arrestin Interactions. *The journal of biological chemistry*. 2010; 285(17): 12522–12535.
- Molina-Martínez L., González-Espinosa C., Cruz S. Dissociation of immunosuppressive and nociceptive effects of fentanyl, but not morphine, after repeated administration in mice: Fentanyl- induced sensitization to LPS. *Brain, behavior and immunity*. 2014; 42: 60-64.
- Neefjes J., Jogsma M., Berlin I. Stop or Go? Endosome Positioning in the Establishment of Compartment Architecture, Dynamics, and Function. *Trends in Cell Biology*. 2017; 27(8): 580-594.
- Nestler E, Alreja M, Aghajanian G. Molecular and cellular mechanisms of opiate action: studies in the rat locus coeruleus. *Brain research bulletin*. 1994: 35; 521-528.
- Nguyen J., Luk K., Vang D., Soto W., Vincent L., Robiner S., Saavedra R., Li Y., Gupta P., Gupta K. Morphine stimulates cancer progression and mast cell activation and impairs survival in transgenic mice with breast cancer. *British journal of analgesia*. 2014; 113: 4-13.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke C, Motoshima H, Fox B, Le Trong I, Teller D, Okada T, Stenkamp R, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*. 2000: 289; 739-745.
- Peterson Y., Luttrell L. The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling. *Pharmacology reviews*. 2017: 69; 256–29.
- Proft J, Weiss N. G protein regulation of neuronal calcium channels: back to the future. *The American society for pharmacology and experimental therapeutics* 2015; 87: 890-906.
- Raehal K., Schmid C., Groer C., Bohn L. Functional Selectivity at the  $\mu$ -Opioid Receptor:

- Implications for Understanding Opioid Analgesia and Tolerance. *Pharmacological Reviews*. 2011; 63(4): 1001-1019.
- Raehal K., Walker J., Bohn L. Morphine Side Effects in  $\beta$ -Arrestin 2 Knockout Mice. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005; 314(3): 1195-1201.
  - Rajagopal S., Shenoy S. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cellular signalling*. 2018; 41; 9-16.
  - Rask A M, Masuram S, Schioth H. The druggable genome: evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication. *The annual review of pharmacology and toxicology*. 2014; 54: 9-26.
  - Raynor K. Kong H, Mestek A, Bye L, Tian M, Liu J, Yu L, Reisine T. Characterization of the Cloned Human Mu Opioid Receptor 1. *The journal of pharmacology*. 1994; 272(1): 423-472.
  - Rock LF, Hardiman G, Timans J, Kastelein AR, Bazan F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *The National Academy of Sciences*. 1998; 95: 588- 593.
  - Rojavin M., Szabo I., Bussiere J., Rogers T., Adler M., Eisenstein T. Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. *Life Sciences*. 1993; 53: 997-1006.
  - Roy S., Gupta K., Ganguly A., Ali H.  $\beta$ -Arrestin2 expressed in mast cells regulates ciprofloxacin-induced pseudoallergy and IgE-mediated anaphylaxis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019.
  - Shang Y, Filizola M. Opioid receptors: Structural and mechanistic insight into pharmacology and signaling. *European Journal of pharmacology*. 2015; 763: 206-213.
  - Shen J., Sun H., Zhang M., Wang Z., Yang. Flurbiprofen improves dysfunction of T-lymphocyte subsets and natural killer cells in cancer patients receiving post-operative morphine analgesia. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2014; 52(8): 669.675.
  - Santella, T., *Drugs. The straight facts. Opium*. Editorial: Chelsea house publishers. 2007.
  - Seachrist J., Ferguson S. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life science*. 2003; 74: 225-235.
  - Scheerer P., Sommer M. Structural mechanism of arrestin activation. *Structural biology*. 2017; 45: 160-169.
  - Simons K. Van Meer G. Lipid Sorting in Epithelial Cells. *Biochemistry*. 1988; 27(17): 6197-6202.
  - Subilano R., Frossi B, Pucillo CE. Mast cell activation: a complex interplay of positive and negative signaling pathways. *European journal of immunology*. 2014; 44(9): 2558-2566.
  - Suzuki K., Ritchie K., Kajikawa E., Fujiwara T., Kusumi A. Rapid Hop Diffusion of a G-Protein-Coupled Receptor in the Plasma Membrane as Revealed by Single-Molecule Techniques. *Biophysical Journal*. 2005; 88: 3659–3680.
  - Sobczak M, Salaga M, Storr M, Fichna J. Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives. *Journal of gastroenterology*. 2014; 49; 24-45.
  - Vu D., Billy C., Yael A., Macdonald C. Cellular Morphine Tolerance Produced by  $\beta$ -Arrestin-2-Dependent Impairment of  $\mu$ -Opioid Receptor Resensitization. *The Journal of Neuroscience*. 2011; 31 (19): 7122–7130.

- Vuong C, UUm V, O'Dell L, Luffy K, Friedman T. The effects of opioids and opioid analogs on animal and human endocrine systems. *Endocrine reviews*. 2010; 31(1); 98-132.
- Wacker D, Stevens R, Rot B. How ligands illuminate GPCR molecular pharmacology. *Cell reviews*. 2017; 170: 414-427.
- Walwyn W., Evans C., Hales T.  $\beta$ -Arrestin2 and c-Src Regulate the Constitutive Activity and Recycling of  $\mu$  Opioid Receptors in Dorsal Root Ganglion Neurons. *The journal of neuroscience*. 2007; 27(19): 5092-5104.
- Wang J, Barke R, Charboneau R, Roy S. Opiate abuse, innate immunity and bacterial infectious diseases. *Archivum Immunologiae et therapeutiae experimentalis*. 2008; 56; 299-309.
- Wang Y., Tang Y., Teng L., Wu Y., Zhao X., Pei G. Association of  $\beta$ -arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nature immunology*. 2006; 7(2); 139-147.
- Williams J., Ingram, S., Henderson, G., Chavkin, C., Zastrow, M., Schulz, S., Koch, T., Evans, C., Christie, C. Regulation of m-opioid Receptors; desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacological Reviews*. 2013; 65;223-254.
- Zhang J., Ferguson S., Barak L., Bodduluri S., Laporte S., Law P., Caron M. Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of m-opioid receptor responsiveness. *Neurobiology*. 1998; 95; 7157–7162.
- Zheng H., Loh H., Law P.  $\beta$ -Arrestin-Dependent  $\mu$ -Opioid Receptor-Activated Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs) Translocate to Nucleus in Contrast to G Protein-Dependent ERK Activation. *Molecular pharmacology*. 2008; 73(1); 178-190.
- Zverkov I., Vinogradov V., Aruin L. Mast cells and cells producing alpha-endorphin in the mucosa of the antral section of the stomach. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1984; 98(11): 621-624.