



Expresión, función y heteromerización de receptores de cannabinoides CB₂ en el sistema nervioso central

Lucía Callén Herrero

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**EXPRESIÓN, FUNCIÓN Y HETEROMERIZACIÓN DE
RECEPTORES DE CANNABINOIDES CB₂ EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Memoria presentada por la Licenciada en Bioquímica
LUCÍA CALLÉN HERRERO
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido inscrita dentro del marco del programa de doctorado en Biomedicina del Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Barcelona durante el trienio 2009-2012.

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por Lucía Callén Herrero bajo la dirección del Dr. Enric I. Canela Campos y el Dr. Rafael Franco Fernández.

Enric I. Canela Campos

Rafael Franco Fernández

Lucía Callén Herrero

Barcelona, Junio 2012

*Creía en infinitas series de tiempos,
en una red creciente y vertiginosa de tiempos
divergentes, convergentes y paralelos.
Esa trama de tiempos que se aproximan,
se bifurcan, se cortan o que secularmente se
ignoran, abarca todas las posibilidades.*

El jardín de los senderos que se bifurcan; J.L. Borges

Al axolotl, al catoblepas, al minotauro,
al gran Hongo, al Kami, a nuestro paredro,
al Lanas, a Pelusi, a las Sombras, a los Seres
Térmicos, a Funes, a la Maga, a Tlön, a las
Valquirias, a las escaleras invertidas, a cabeza
de globo, a todos los fantasmas y a sus
perseguidores, a los innombrables, a las
víctimas de nuestra Ciencia, a los desiertos, a
los que están detrás de la puerta, a Ella, a su
estela y a la otra orilla.

ACRÓNIMOS

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Receptores acoplados a proteína G	15
1.1.1. Estructura y señalización de los GPCR	16
1.1.2. Clasificación de los GPCR	17
1.1.3. La actividad constitutiva de los GPCR	18
1.2. Interacción molecular entre GPCR: Oligomerización	20
1.2.1. Técnicas utilizadas para el estudio de la oligomerización de los GPCR	20
1.2.2. Arquitectura de los oligómeros de GPCR	24
1.2.3. Características farmacológicas de los oligómeros. “Two-State Dimer Receptor Model” o modelo de receptores diméricos	27
1.2.4. Consecuencias funcionales de la oligomerización de GPCR	30
1.3. Receptores de cannabinoides	32
1.3.1. Sistema endocannabinoide	32
1.3.2. Receptor de cannabinoides CB ₁	38
1.3.3. Heterodimerización de los receptores CB ₁	44
1.3.4. Receptor de cannabinoides CB ₂	45
1.4. Sistema endocannabinoide y desarrollo neuronal	50
1.4.1. Receptores de cannabinoides en el desarrollo	51
1.4.2. <i>Xenopus laevis</i> como modelo de desarrollo embrionario	52
1.4.2.1. Desarrollo del sistema nervioso en <i>Xenopus laevis</i>	55
1.4.2.2. Desarrollo craneofacial. Inducción de las placodas craneales	59
1.5. Otros receptores acoplados a proteína G	67
1.5.1. Receptores de adenosina A _{2A}	67
1.5.2. Receptores de adenosina 5HT _{2A}	70
2. OBJETIVOS	75
3. RESULTADOS	83
Declaración de los resultados y resumen de las publicaciones	85

3.1. Expresión del mRNA codificante para el receptor de cannabinoides tipo 2 en el complejo palidal de <i>Macaca fascicularis</i>	87
3.2. La sobreexpresión del mRNA de los receptores de cannabinoides CB ₂ impide el correcto desarrollo de los nervios craneales en embriones de <i>Xenopus laevis</i>	99
3.3. Los receptores de cannabinoides CB ₁ y CB ₂ forman heterómeros funcionales en el cerebro	131
3.3.1. Anexo 1: Los CB ₂ R se expresan como homómeros en células transfectadas	161
3.4. Anexo 2: Los CB ₂ R pueden formar heterómeros con otros GPCR como los receptores de serotonina o adenosina	165
4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	179
5. CONCLUSIONES	197
6. BIBLIOGRAFÍA	205

ACRÓNIMOS

2-AG	2- Araquidonoilglicerol
5-HT	Serotonina
5-HT _n R	Receptor de Serotonina 5-HT _n
Δ ⁹ -THC	Δ ⁹ -Tetrahidrocannabinol
AC	Adenilato ciclasa
ACEA	Araquidonil-2-cloroethylamida
ADA	Adenosine deaminase
AEA	Anandamida
AM630	6-yodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1 <i>H</i> -indol-3-yl](4-metoxifenil)metanone
AM251	<i>N</i> -(Piperidin-1-yl)-5-(4-yodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida
AMPA	ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
A _n R	Receptores de adenosina A _n
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BiFC	<i>Bimolecular fluorescence complementation</i>
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>
BMP	Proteína morfogenética del hueso
CaMK	Proteína kinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina protein kinase
AMPc	3',5'-adenosinamonofosfato cíclica
CB _n R	Receptores de cannabinoides CB _n
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
CGS-21680	2-p-(2-Carboxietil)-fenetilamino-5' <i>N</i> '-etilcarboxamido-adenosina
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CNS	Sistema nervioso central
COX2	Ciclooxigenasa de tipo 2
CP-55,940	(-)- <i>cis</i> -3-[2-Hidroxi-4-(1,1-dimetilheptil)fenil]- <i>trans</i> -4-(3-hidroxiopropil)ciclohexanol
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina y cAMP de 32 kDa
DAT	Transportador de dopamina
D _c	Índice de cooperatividad del dímero
DGL	Diacilglicerol lipasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
D _n R	Receptores de dopamina D _n
DOPA	3,4-Dihidroxi-fenilalanina
DPCPX	8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina
DRG	Raíz del ganglio dorsal
DSE	<i>Depolarization-Induced Supression of Excitation</i>
DSI	<i>Depolarization-Induced Supression of Inhibition</i>
ECL	Dominio extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminatetra-acético
ER	Retículo endoplasmático
ERK 1/2	Extracellular regulated kinase 1/2
FAHH	Amida hidrolasa de ácidos grasos

FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFP	Proteína verde fluorescente
GIRK	Canal de potasio rectificador de la corriente interna
GMPc	3',5'-guanosinamonofosfato cíclica
Gpe/i	Globo pálido externo /interno
GRK	Quinasa de receptors acoplados a proteína G
GST	Glutación-S-transferasa
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GPR55	Receptor acoplado a protein G 55
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HOX	<i>Homeobox</i> (familia de genes)
HU-210	(6aR)- <i>trans</i> -3-(1,1-Dimetilheptil)-6a,7,10,10a-tetrahidro-1-hidroxi-6,6-dimetil-6H-dibenzo[b,d]piran-9-metanol
HU-308	4-[4-(1,1-Dimetilheptil)-2,6-dimethoxyphenil]-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-metanol
IC	Loop intracelular
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
ISH	<i>In situ hybridization</i>
K _D	Constante de disociación
K _{DH}	Constante del equilibrio de disociación en el estado de alta afinidad
K _{DL}	Constante del equilibrio de disociación en el estado de baja afinidad
KW-6002	(E)1,3-dietil-8-(3,4-dimetoxiestiril)-7-metil-xantine
JNK	Kinasa c-Jun
JWH-133	(6aR,10aR)-3-(1,1-Dimetilbutil)-6a,7,10,10a-tetrahidro-6,6,9-trimetil-6H-dibenzo[b,d]pirano
LTD	<i>Long term depression</i>
LTP	<i>Long term potentiation</i>
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAO	Oxidasa monoamina
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamate
mPFC	Corteza prefrontal media
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MPTP	N-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MSX-2	3-(3-hidroxiopropil)-7-metil-8-(m-metoxiestiril)-1-ropargil-xantina
MSN	Neuronas espinosas medianas
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NADA	N-araquidonildopamina
NAD(P) ⁺	Dinucleótido (fosfato) de nicotinamida adenina
NArPE	N-araquidonilfosfatidiletanolamina
NAT	N-aciltransferasa
NCC	Células de la cresta neural
NMDA	N-Metil-D-aspartato

NO	Óxido nítrico
OX _n R	Receptores de orexina n
PA	Ácido fosfatídico
PAG	Sustancia gris pericuaductal
PBP	Proteínas de union periplasmicas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinasa
PKA/B/C	Proteína kinasa A/B/C
PL A2/C/D	Fosfolipasa A2/C/D
PP-2A	Proteína fosfatasa 2
PSD	Densidad postsináptica
PSM	Maquinaria perisináptica
PTX	Toxina pertúsica
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RA	Ácido retinoico
RET	Tranferencia de energía de resonancia
Rluc	Renilla luciferasa
R-PIA	R-fenilisopropiladenosina
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
SAM	S-adenosilmetionina
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Shh	proteína homóloga de sonic hedgehog
SN	Substancia nigra
SNc/r	Substancia nigra compacta/reticulada
SRET	Transferencia de energía resonante secuencial
STD	Short term-depression
STN	Núcleo subtalámico
SVZ	Zona subventricular
Thp	Triptófano hidrolasa
TKR	Receptor tirosina kinasa
TM(D)	Dominio transmembrana
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
Twhh	proteína hedgehog tiggy-winkle
SAH	S-adenosilhomocisteína
SSTR	Receptor de somatostatina
VDCC	Canal de Ca ²⁺ dependiente de voltaje
VTA	Área ventral tegmental
WIN55,212-2	(R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naftalenilmetanone mesilato
WNT	<i>Wingless-related MMTV integration site</i>
YFP	Proteína amarilla fluorescente

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Receptores acoplados a proteína G

Diversas estrategias en la membrana plasmática otorgan a las células la capacidad de interactuar con su medio externo. Las membranas celulares no constituyen tan sólo una mera barrera de separación con el medio, sino que son el principal elemento de comunicación con el entorno extracelular. Uno de los mecanismos mejor estudiados para dicha comunicación es la expresión de proteínas de membrana que actúan a modo de procesadores selectivos para las moléculas del medio; esto es, receptores de moléculas extracelulares. Entre ellos, los receptores acoplados a proteína G (GPCR) constituyen el grupo más grande y versátil de receptores de superficie implicados en la transducción de señal (Gudermann et al., 1997; Marinissen y Gutkind, 2001). Estos receptores están codificados por una gran variedad de genes que representan casi el 2% del genoma humano (Jacoby, 2006), de los cuales, más del 90% se expresan en el sistema nervioso central (George et al., 2002). Los ligandos, ya sean endógenos o exógenos y de naturaleza más bien versátil: hormonas, péptidos, aminoácidos, lípidos, nucleótidos, iones, moléculas de olor o de luz, son capaces de modular a los GPCR de manera selectiva, provocando una transducción de señal a un gran número de efectores y segundos mensajeros intracelulares (p.e. adenilato ciclasa, fosfolipasas, canales iónicos, etc.).

De esta manera, los GPCR están implicados, a nivel molecular, en numerosos procesos fisiológicos tales como: el metabolismo, la diferenciación, la proliferación, la inflamación, la neurotransmisión, la secreción, etc. (**Figura 1.1**) que afectan al individuo en su conjunto y que pueden verse comprometidos durante los procesos patológicos, lo que puede conllevar numerosas enfermedades. De aquí la gran trascendencia de su estudio, pues constituyen las dianas para el diseño de nuevos fármacos agonistas o antagonistas de los GPCR (Marinissen y Gutkind, 2001).

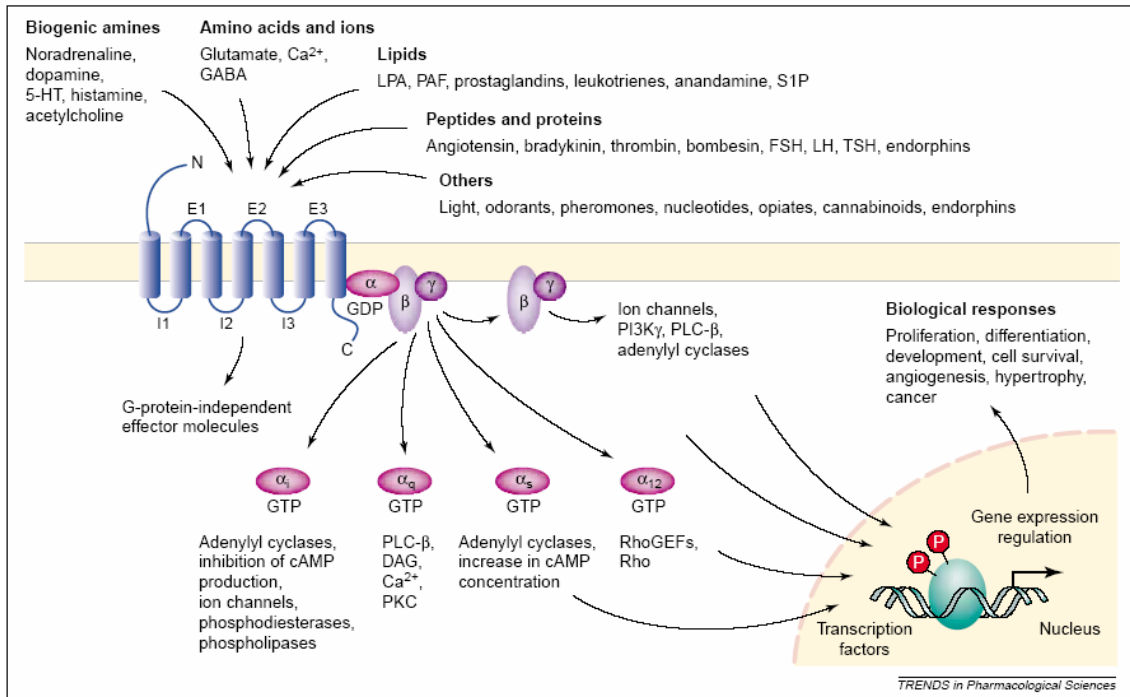


Figura 1.1. Estructura de un receptor acoplado a proteína G y sus mecanismos de transducción implicados en diversas funciones fisiológicas. (Extraído de Marinissen y Gutkind, 2001).

1.1.1. Estructura y señalización de los GPCR

Se consideran GPCR a aquellas proteínas de una sola cadena aminoacídica que atraviesan la membrana siete veces, ya que poseen siete secuencias de 25 a 35 aminoácidos hidrofóbicos en estructura de hélice α que pueden internalizarse en la membrana plasmática. Una característica de estos receptores es que están acoplados a proteína G. El ligando se une a esta estructura compacta de hélices α provocando cambios conformacionales transmitidos a la proteína G e induciendo el intercambio de GDP de la subunidad α por GTP. Como consecuencia, se produce la disociación de la subunidad α -GTP por un lado y el dímero $\beta\gamma$ por otro. Ambas partes de la proteína G pueden modular moléculas efectoras (adenilato y guanilato ciclasas, fosfodiesterasas, fosfolipasas A2 y C, fosfoinositol 3-Kinasa, etc.) y activar o inhibir una ruta bioquímica a través de segundos mensajeros (AMPc, GMPc, diacilglicerol, inositol 3-fosfato, fosfatidil inositol 3-fosfato, ácido araquidónico y fosfatídico etc.). Finalmente, la actividad GTPasa de la subunidad α es la causa de que se hidrolize el GTP a GDP, como consecuencia se produce la unión de la subunidad α al dímero $\beta\gamma$, se reconstituye de nuevo la proteína G trimérica y la señal puede concluir (Bourne et al., 1991). En

algunos casos, los GPCR pueden utilizar mecanismos independientes de la proteína G, lo cual amplía la diversidad de señales (Daaka et al., 1998).

La persistente unión de un ligando a un GPCR puede iniciar un proceso de desensibilización del receptor disminuyendo así los efectos de su señalización. Con este mecanismo conservado entre los GPCR se evitan problemas de estimulación excesiva. En estos casos, se produce una fosforilación del receptor por kinasas intracelulares específicas para este tipo de receptores (GRK) o inespecíficas (PKA y PKC). Los residuos fosforilados sirven de anclaje para las β -arrestinas, formándose un complejo que impide la unión del receptor a la proteína G (Lefkowitz, 1998). La internalización del receptor, en muchos casos mediada por vesículas de clatrina, a compartimentos endosomales permite su desfosforilación y su reciclaje a la membrana o su degradación lisosomal (Métayé et al., 2005).

1.1.2. Clasificación de los GPCR

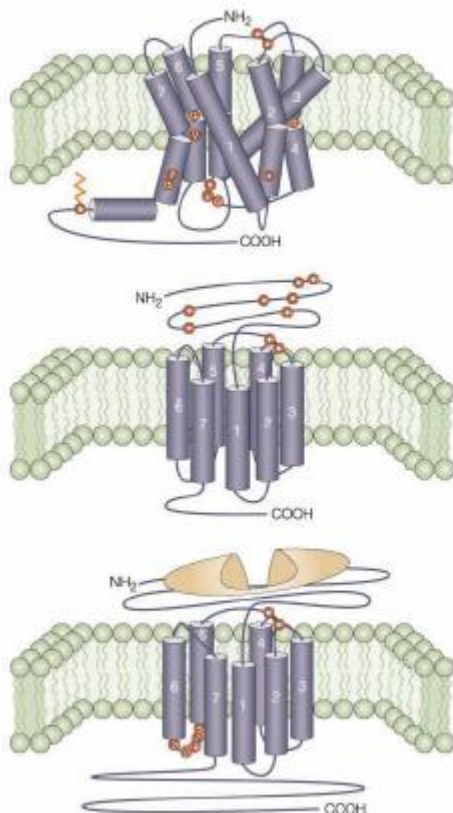
El sistema Kolakowski (Kolakowski, 1994) clasifica los GPCR en familias según su estructura y características genéticas (Figura 1.2). El denominador común de todas ellas son los siete dominios transmembrana, mientras sus principales diferencias se establecen en relación al tamaño y función del dominio N-terminal, del C-terminal y de los bucles intracelulares. Además, las distintas familias no tienen secuencias homólogas, lo que implica que no existe una relación filogenética entre ellas.

1. Familia A. Forman parte de esta familia el 90% de todos los GPCR. Existen pocos residuos conservados, pero éstos son esenciales para la estructura y funcionalidad del receptor. Poseen un motivo Asp-Arg-Tyr (DRY) en la parte interna del segmento transmembrana 3 implicado en la activación (Ohyama et al., 2002). También existe un puente disulfuro que une el primer y el segundo bucle extracelular (EC1-2). Pueden contener, además, una cisteína palmitoilada en la cola C-terminal para su anclaje a la membrana. Los receptores de esta familia se caracterizan por su similitud con el receptor de la rodopsina, cuya estructura cristalográfica reveló dominios transmembrana no del todo perpendiculares a la membrana debido a la presencia de prolina en las

hélices transmembrana. Generalmente, el ligando se une a la cavidad interna que constituyen los dominios transmembrana, aunque existen subfamilias capaces de unir péptidos pequeños a través de sus bucles extracelulares y el dominio N-terminal (George et al., 2002; Jacoby, 2006).

2. Familia B. Está constituida por unos 50 receptores de hormonas peptídicas y neuropéptidos. Poseen un extremo N-terminal relativamente largo (100 residuos aprox.) con varias cisteínas formando una red de puentes disulfuro (Ulrich et al., 1998) que constituye el lugar de reconocimiento de los ligandos (George et al., 2002; Jacoby, 2006).

3. Familia C. Estos receptores se caracterizan por poseer extremos carboxi- y amino- terminal muy largos (500-600 aminoácidos). El lugar de unión al ligando forma un dímero unido por un puente disulfuro (Pin et al., 2003) que puede abrirse o cerrarse durante la unión. El tercer bucle intracelular es corto y está altamente conservado (George et al., 2002).



Familia A

- Receptores de aminas biógenas (adrenérgico, serotonina, dopamina, muscarínico, histamina)
- Receptores de neurotensina y TRH
- Receptores de opsina
- Receptores de adenosina y cannabinoides
- Receptores de nucleótidos, oxitocina y somatostatina
- Receptores de melatonina

Familia B

- Receptores de calcitonina
- Receptores PTH
- Receptores de glucagón, VIP y secretina
- Receptores de latrotoxina

Familia C

- Receptores metabotrópicos de glutamato
- Receptores metabotrópicos de GABA
- Receptores de calcio
- Receptores de feromonas vomeronasales
- Receptores gustativos

Figura 1.2. Estructura de las principales familias de los GPCR. Los residuos altamente conservados se indican en círculos rojos. (Extraído de George et al., 2002).

1.Introducción

Las familias D y E están constituidas por receptores de feromonas de levadura. La familia F la forman cuatro receptores diferentes de AMPc en *Dictyostelium Discoideum* (Kolakowski, 1994).

Existen otras clasificaciones, basadas en estudios filogenéticos, en las cuales los GPCR humanos se dividen en cinco familias principales: *Glutamate*, *Rhodopsin*, *Adhesion*, *Frizzled/Tasted2* y *Secretin*. Dentro de cada familia los receptores comparten un origen filogenético común (Fredriksson et al., 2003). Los autores de este nuevo sistema de clasificación defienden la teoría de que los receptores acoplados a proteína G surgieron a partir de un único predecesor común que evolucionó, a través de duplicaciones génicas, desde la mayor simplicidad en sus orígenes hasta la enorme complejidad que muestra la superfamilia de estos receptores en la actualidad. La enorme diversidad que alcanza esta superfamilia de proteínas de membrana pone en relevancia su importancia en la fisiología de cualquier organismo.

1.1.3. La actividad constitutiva de los GPCR

Como ya se ha comentado anteriormente, la unión de un ligando al receptor provoca un cambio conformacional desde un estado inactivo a otro activo, estableciéndose un equilibrio entre ambos estados. En ausencia de ligando, el receptor puede isomerizar al estado activo presentando una actividad constitutiva (Seifert y Wenzel-Seifert, 2002). Este cambio, en el equilibrio, induce el intercambio GDP-GTP en las proteínas G acopladas al receptor y aumenta la actividad basal de la proteína G y de los sistemas efectoras. La actividad constitutiva se inhibe por los denominados agonistas inversos, los cuales se unen estabilizando el estado inactivo y disminuyen el intercambio GDP-GTP, mientras los agonistas estabilizan su forma activa e inducen la señalización. De hecho, se ha propuesto que existen varias conformaciones de los receptores, cada una de ellas con distintas actividades biológicas que están estabilizadas por distintos ligandos: agonistas, agonistas parciales, antagonistas y agonistas inversos (Seifert y Wenzel-Seifert, 2002).

1.2. Interacción molecular entre GPCR: Oligomerización

Los GPCR no han de considerarse como una unidad autónoma funcional ya que pueden interactuar molecularmente con muchas otras proteínas en el entorno de la célula. Es decir, los GPCR pueden interactuar con multitud de proteínas a ambos lados de la membrana (verticalmente) e incluso con otros receptores o canales iónicos en la membrana, de manera horizontal (Franco et al., 2003). Dicha promiscuidad da lugar a una enorme variabilidad en cuanto a repercusiones fisiológicas. Este hecho, sin embargo, no ha sido tan fácilmente aceptado dentro de la comunidad científica y la visión de los GPCR como homo- y heterómeros ha representado un concepto revolucionario. Hoy en día, se acepta que la oligomerización es un hecho común en la biología de los receptores (Prinster et al., 2005; Pin et al., 2007; Carriba et al., 2008; Ferré et al., 2009) y parece ser que la mayoría de los GPCR, si no todos, se expresan en su forma homomérica (Bouvier, 2001; George et al., 2002; Ferré et al., 2009). Además de la homomerización, los receptores pueden unirse con otros receptores distintos para dar heterómeros, que resultan de la asociación u oligomerización entre dos o múltiples monómeros diferentes. Los oligómeros suponen una nueva y más compleja manera de concebir a los receptores debido a que pueden presentar características funcionales diferentes a las de sus unidades monoméricas por separado. Esto permite entender las interrelaciones o *cross-talk* presentados entre distintos sistemas de neurotransmisores, así como la intrincada diversidad y plasticidad del sistema nervioso y abre nuevas perspectivas para el diseño de fármacos contra los desórdenes nerviosos (Ferré et al., 2009).

1.2.1. Técnicas utilizadas para el estudio de la oligomerización de los GPCR

Las primeras evidencias que apuntaban la posible formación de homómeros, con una estructura mínima de homodímeros entre GPCR, fueron los estudios farmacológicos con radioligandos. Las curvas de unión de agonistas a los receptores en preparaciones de membranas celulares o tisulares exhaustivamente lavadas ponían de

1.Introducción

manifiesto una cooperatividad positiva o negativa que, en algunos casos, sólo podía explicarse por un fenómeno de interacción molecular entre los receptores (Limbird et al., 1975; Mattera et al., 1985; Wreggett y Wells, 1995; Franco et al., 2006; Casadó et al., 2007).

De manera clásica, las técnicas de coinmunoprecipitación han sido una de las técnicas más utilizadas para demostrar interacciones entre receptores. De esta manera, se demostró la interacción entre receptores β_2 -adrenérgicos (Hebert et al., 1996), la homomerización de receptores de dopamina D_2 (Ng et al., 1996), de receptores metabotrópicos de glutamato tipo 5 (mGlu5) (Romano et al., 1996), de receptores de δ -opioides (Cvejic y Devi, 1997) y de serotonina 5-HT_{2C} (Herrick-Davis et al., 2004) entre otros, o bien, la heteromerización entre los receptores opioides y los β_2 -adrenérgicos (Jordan et al., 2001) o entre el receptor de cannabinoides CB₁ y el de angiotensina II tipo 1 (Rozenfeld et al., 2011). Sin embargo, las coinmunoprecipitaciones requieren la solubilización del receptor de membrana y ésto no permite descartar la posibilidad de que la formación de dichos complejos sea debida a la formación de agregados de proteínas, altamente hidrofóbicas, por el tratamiento con detergentes. Era necesario entonces demostrar la interacción de estas entidades en células vivas. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas de transferencia de energía por resonancia (RET).

En las técnicas de transferencia de energía por resonancia, entre ellas las más comunes: FRET (*fluorescent resonance energy transfer*) o BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) (Figura 1.3), la transferencia de energía no radiante (dipolo-dipolo) desde las moléculas de un dador a un aceptor es proporcional a la distancia existente entre ellas elevada a la sexta potencia (Jares-Erijman y Jovin, 2003). Por tanto, aquellos dadores y aceptores, con espectros de emisión y excitación solapados, que se encuentren a una distancia máxima de 100 Å (distancia a la cual se encuentran la mayoría de complejos multiproteicos (Stryer, 1978)), experimentarán RET, mientras que los que se encuentren a mayores distancias no lo harán. En las técnicas de FRET, los receptores se fusionan a proteínas pequeñas que actúan como dador y aceptor, típicamente formas mutadas de la proteína verde GFP como GFP² e YFP, que pueden actuar como dador y aceptor respectivamente. En la técnica de BRET, un receptor se fusiona a la proteína fluorescente YFP y el otro receptor se fusiona al enzima Renilla

luciferasa, la cual cataliza la conversión de coelenterazina a coelenteramida cuando ésta se añade a la preparación celular, generando un pico de luz a aproximadamente 470nm (Pfleger y Eidne, 2003). La luz emitida excita la YFP en el segundo receptor (aceptor) con lo que se genera un pico de fluorescencia a 530nm. Este proceso se denomina BRET¹ aunque también existe el denominado BRET² en el que el sustrato oxidado por la luciferasa es *Deep Blue C*, el cual emite luz a 400nm y puede excitar a la proteína GFP² que a su vez emitirá a 510nm. La ventaja principal de las técnicas de BRET es que se evitan los problemas asociados a la exposición de luz de alta intensidad que pueden dar lugar a autofluorescencia, fotobleaching y fototoxicidad. Sin embargo, presenta limitaciones instrumentales y la resolución no es muy alta, no pudiendo ser utilizado, por ejemplo, para investigar los dominios subcelulares en los que se expresan los oligómeros. En este último caso, se puede utilizar la técnica de FRET utilizando un microscopio confocal. Es importante tener en cuenta que, además de la distancia entre el dador y el aceptor, la orientación de ambas moléculas es fundamental para que se produzca la transferencia de energía por FRET o BRET. Así, las técnicas RET ofrecen la posibilidad de detectar interacciones entre dos proteínas en células vivas e incluso, con la reciente innovación técnica desarrollada por miembros de nuestro grupo que combina procesos de BRET y de FRET, es posible detectar también complejos triméricos (Carriba et al., 2008).

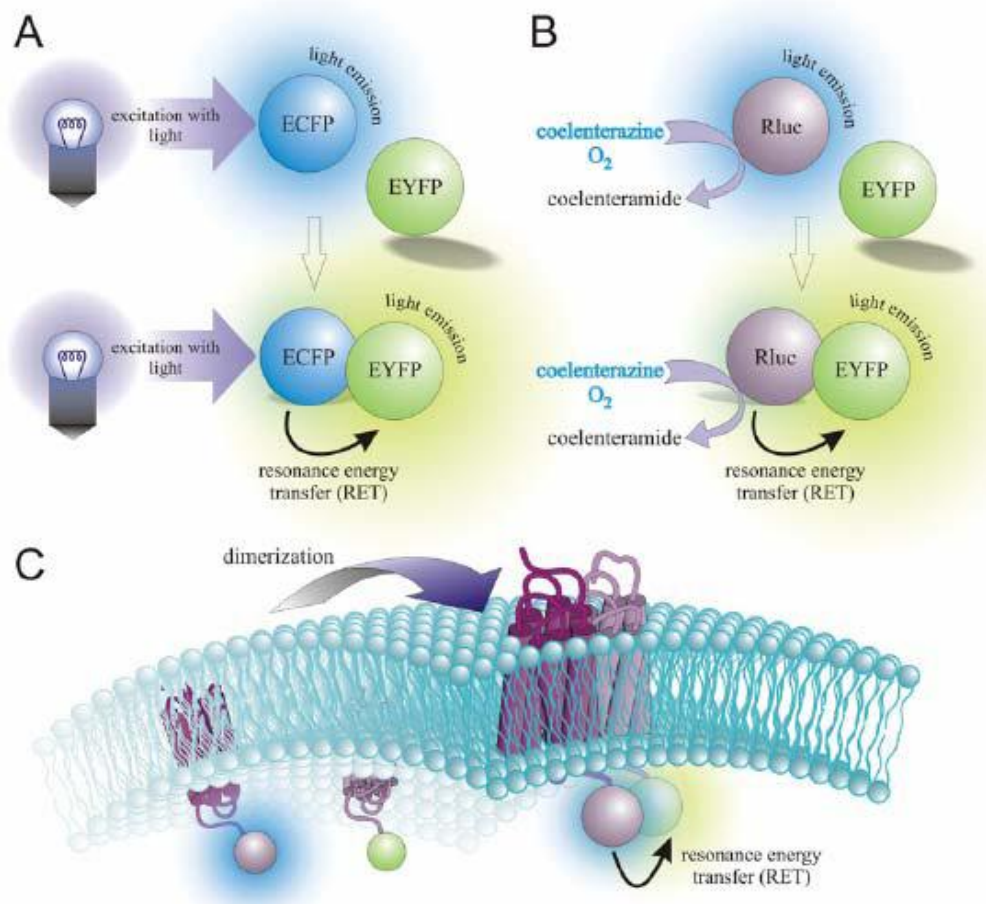


Figura 1.3. Transferencia de energía por resonancia (RET). El FRET requiere la excitación de la molécula fluorófora dadora por luz para que pueda transferir energía a la molécula aceptora siempre y cuando el dador y el aceptor estén suficientemente juntos (A), mientras que en el BRET, el dador *Rluc* cataliza la reacción de la coelenterazina a coelenteramida, emitiéndose luz que puede excitar al aceptor si se encuentra lo suficientemente próximo (B). En (C) se muestra cómo el dador y el aceptor se pueden fusionar a dos receptores en la membrana para producir RET si los receptores oligomerizan (Extraído de Pflieger y Eidne, 2005).

Mediante estas técnicas, se ha demostrado la existencia de homodímeros de los receptores β_2 -adrenérgico (Angers et al., 2000), δ -opiode (McVey et al., 2001) y A_{2A} de adenosina (Canals et al., 2004) entre otros. También se han utilizado para el estudio de heterómeros de receptores acoplados a proteína G, como por ejemplo entre los receptores de somatostatina $SSTR_{2A}$ y $SSTR_{1B}$ (Rocheville et al., 2000b), los receptores de somatostatina $SSTR_{1B}$ y los D_2 de dopamina (Rocheville et al., 2000a), los receptores A_{2A} de adenosina y D_2 de dopamina (Canals et al., 2003), los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina (Ciruela et al., 2006), los receptores A_{2A} de adenosina y CB_1 de cannabinoides

(Carriba et al., 2007) o más recientemente, entre los receptores μ -opioide y el de serotonina 5-HT_{1A} (Cussac et al., 2012).

En los últimos años, se han desarrollado numerosas variantes de estas técnicas como el *photobleaching* FRET o el *time-resolved* FRET (Pfleger y Eidne, 2005) además del SRET que permite detectar complejos triméricos (Carriba et al., 2008; Navarro et al., 2008) o las técnicas BIFC (*Bimolecular fluorescence complementation*) que permiten detectar heterotrímeros al igual que heterodímeros, utilizando dos fragmentos de la proteína dadora o aceptora (p.e nYFP y cYFP) que sólo son capaces de emitir fluorescencia cuando se reconstituyen, mediante la interacción de las proteínas a las cuales están fusionados, esto es, si se encuentran una distancia menor de 6nm (Gandia et al., 2008).

1.2.2. Arquitectura de los oligómeros de GPCR

Teniendo en cuenta los oligómeros de GPCR, se considera la forma dimérica como la unidad estructural mínima. El fenómeno de la dimerización de GPCR se explica atendiendo a dos posibilidades, dado que las interacciones pueden ser directas o indirectas. Las interacciones indirectas tienen lugar por medio de otras proteínas, como es el caso de las proteínas del citoesqueleto. Por el contrario, las interacciones directas implican interacciones entre distintos dominios de los receptores. En la mayoría de los casos, los dímeros se forman en el retículo endoplasmático, antes de llegar a la membrana plasmática, y no son modulables por ligando. Una vez unidos, los receptores adquieren características y propiedades inherentes a la nueva entidad oligomérica. En las interacciones indirectas, pueden participar proteínas citosólicas o *scaffolding proteins* que actúan a modo de anclaje y dan lugar a asociaciones proteicas complejas, pudiendo interactuar con otras proteínas involucradas en la transducción de la señal. Las interacciones directas pueden tener lugar mediante diferentes mecanismos: enlaces covalentes (puentes disulfuro) y/o no covalentes (fuerzas hidrofóbicas y/o electrostáticas) entre los dominios transmembrana y/o los dominios intracelulares de los receptores, tal y como se muestra en la **figura 1.4.**

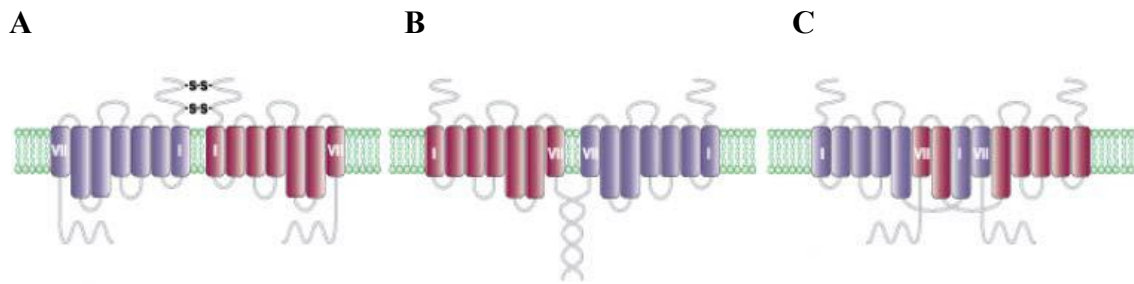


Figura 1.4. Mecanismos de oligomerización directa entre los GPCR. A. Formación de puentes disulfuro (Receptores de calcio y glutamato). B. Interacción *coiled-coil* (Receptores GABA). C. Interacción transmembrana (Receptores dopamina, muscarínicos, β 2-adrenérgicos). (Extraído y modificado de Bouvier, 2001).

En la familia C de los GPCR, el gran dominio N-terminal extracelular contiene varios residuos de cisteína que pueden contribuir a la dimerización mediante puentes disulfuro (Romano et al., 1996, 2001). De hecho, se ha demostrado que la eliminación de este dominio previene la dimerización del receptor metabotrópico de glutamato mGlu1. Por otro lado, una mutación puntual del residuo clave de cisteína de estos receptores indica que este residuo participa en la dimerización aunque no constituye un punto de contacto único (Ray y Hauschild, 2000). En la oligomerización de los receptores de la familia A, los puentes disulfuro también pueden intervenir. Así, se ha descrito la disociación del homodímero de los receptores κ - y δ -opioides o de los receptores D₁ de dopamina usando agentes reductores (Cvejic y Devi, 1997; Jordan y Devi, 1999; Lee et al., 2000). Sin embargo, la disociación del oligómero tras el tratamiento con agentes reductores no se detecta por igual en todos los receptores (Lee et al., 2000).

En la heterodimerización de las dos isoformas de los receptores GABA (GABA_{B1} y GABA_{B2}), se ha descrito una interacción directa entre dominios *coiled-coil* localizados en los extremos C-terminal de los mismos (White et al., 1998). Sin embargo, estudios de mutagénesis dirigida han revelado que, si bien el dominio *coiled-coil* es importante para la funcionalidad del receptor, éste no es el único responsable de la heterodimerización, ya que la delección de este dominio no consigue eliminar la formación del heterodímero (Margeta-Mitrovic et al., 2000). El receptor δ -opiode constituye otro ejemplo en el que el dominio C-terminal es fundamental para la

oligomerización, tanto es así que una delección de los últimos 15 aminoácidos del receptor provoca la pérdida de la capacidad de dimerización (Cvejic y Devi, 1997).

Globalmente, la dimerización directa entre GPCR puede estar mediada por interacciones iónicas o hidrofóbicas entre los dominios extracelulares, intracelulares o transmembrana del receptor. Se ha demostrado la interacción iónica entre péptidos presentes en los dominios intracelulares que contienen, respectivamente, dos o más cargas positivas adyacentes, por ejemplo RR, KK o RKR, y dos o más cargas negativas: DD o EE, o residuos aminoacídicos fosforilados (Woods y Huestis, 2001; Woods et al., 2002). En nuestro grupo de investigación, se ha demostrado la participación de residuos cargados y/o fosforilados en la heteromerización de los receptores A_{2A} de adenosina y D₂ de dopamina (Canals et al., 2004) o entre los receptores A_{2A} de adenosina, D₂ de dopamina y CB₁ de cannabinoides (Navarro et al., 2010). La idea de que las interacciones hidrofóbicas podrían tener un papel relevante en la formación de los dímeros se postuló por primera vez para el receptor β₂-adrenérgico. Mediante el uso de péptidos sintéticos y mutagénesis dirigida, se propuso que residuos concretos de glicina y de leucina, situados en el sexto dominio transmembrana del receptor, estaban involucrados en su dimerización (Hebert et al., 1996).

Mediante estudios computacionales (Gouldson et al., 2000), se han propuesto dos modelos alternativos tridimensionales que explicarían la dimerización de los receptores acoplados a proteína G. En ambos modelos, los dominios transmembrana cinco y seis (TM5-6) estarían involucrados en el contacto entre receptores, así como el tercer bucle intracelular (IC3). El primer modelo se conoce como *domain swapping model*, o modelo del intercambio de dominio, y considera que cada unidad funcional en el dímero está compuesta por los 5 primeros dominios transmembrana de un receptor y los dos últimos del otro. Así, si los dos dominios por separado de un mismo receptor se coexpresan conjuntamente se recupera el receptor funcional (Scarselli et al., 2000). Este modelo racionaliza la complementación funcional observada por Maggio y colaboradores con las quimeras de los receptores α₂-adrenérgico y M₃ muscarínico (Maggio et al., 1993). El segundo es el “modelo de contacto” y considera que el dímero se formaría por empaquetamiento lateral de monómeros individuales, dónde los dominios cinco y seis de cada monómero formarían la interfase de interacción. Éste

sería el caso para el receptor V_2 de vasopresina (Schulz et al., 2000). Ambos modelos están representados en la **figura 1.5**.

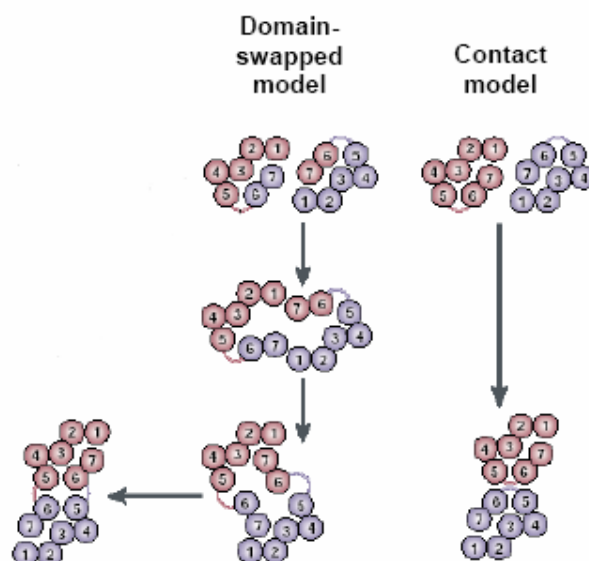


Figura 1.5. Modelos tridimensionales de la dimerización de los GPCR.

1.2.3. Características farmacológicas de los receptores oligoméricos. “Two-State Dimer Receptor Model” o el modelo de receptores diméricos.

Clásicamente, para el análisis de la unión de ligandos a un GPCR, se ha considerado al receptor en su forma monomérica. El ajuste de datos experimentales que dan lugar a diagramas de *Scatchard* lineales, cuando estos se ajustan a un modelo de un centro de unión, permite calcular la K_D o constante de afinidad. Sin embargo, la unión de agonistas a los GPCR a menudo genera representaciones de *Scatchard* no lineales y, en estos casos, los resultados se ajustan tradicionalmente al modelo de “dos centros independientes” que consideran la existencia de dos estados no interconvertibles del receptor: un estado de alta afinidad (o acoplado a proteína G) y un estado de baja afinidad (o desacoplado a proteína G). El ajuste de los datos a este modelo permite el cálculo de dos constantes de afinidad: una para el estado de “alta afinidad” (K_{DH}) y otra para el estado de “baja afinidad” (K_{DL}). Sin embargo, se ha observado que el agonista induce cambios en la proporción de los llamados estados de “alta” y “baja” afinidad, lo cual indica que estos dos estados no pueden existir independientemente, sino que están interconectados (Wong et al., 1986) y esta aparente interconversión entre estados es independiente de la proteína G (Casadó et al., 1990). Además, trabajando con receptores

de adenosina A_1 , se demostró que un agonista total puede provocar un cambio aparente en la proporción de receptores en estado de alta y baja afinidad (Casadó et al., 1990). Si el agonista es capaz de variar la proporción de los estados de alta y baja afinidad, estas dos formas deben estar en equilibrio, con lo cual, el modelo de dos centros independientes no puede representar adecuadamente el comportamiento de las curvas bifásicas de *Scatchard* si los estados de afinidad están en equilibrio.

Dado que actualmente se conoce que los GPCR forman dímeros, las isotermas de unión bifásicas (representaciones de *Scatchard* no lineales) y las curvas de competición bifásicas pueden interpretarse de una manera más directa considerando la existencia de cooperatividad. La cooperatividad positiva o negativa puede explicarse de manera natural asumiendo que la unión de la primera molécula de ligando a uno de los monómeros del dímero modifica los parámetros de unión de la segunda molécula de ligando al otro monómero del dímero, como ocurre en el caso de las enzimas. Recientemente, se han desarrollado modelos que consideran al dímero como la unidad básica (Durrourx, 2005; Franco et al., 2005, 2006; Albizu et al., 2006). Nuestro grupo de investigación ha formulado el “Two-State Dimer Receptor Model” (“modelo de receptores diméricos”), que considera el homodímero como la unidad básica (Franco et al., 2005, 2006) (**Figura 1.6**). Este modelo considera que el cambio conformacional inducido por un ligando desde uno de los componentes del dímero es transmitido al otro componente a través de un fenómeno de cooperatividad y permite calcular un parámetro que mide el grado de cooperatividad (D_c). Es una extensión del modelo de “dos estados de activación de un receptor”, pero considera que las estructuras diméricas son capaces de unir una molécula en el centro ortostérico de cada monómero. Asumiendo la isomerización del receptor entre las especies inactiva (RR) y activa (RR*), el modelo es capaz de explicar el comportamiento de los GPCR para los cuales la representación de *Scatchard* no es lineal (Franco et al., 2005, 2006).

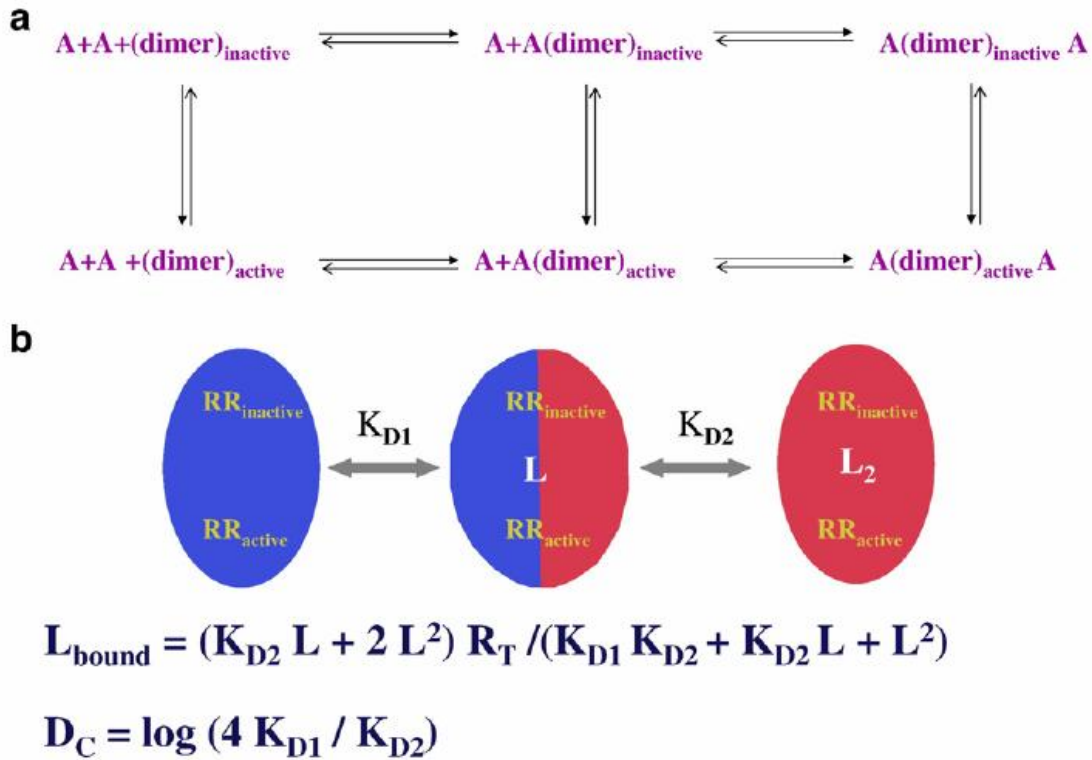


Figura 1.6. Esquema y ecuaciones del “modelo de receptores dimérico” (“Two-State Dimer Receptor Model”). El dímero puede ser inactivo o activo y puede estar vacío u ocupado por una o dos moléculas de ligando. a) Modelo macroscópico b) Modelo simplificado que incluye las constantes de disociación macroscópicas en el equilibrio (K_{D1} y K_{D2}), que definen la unión de la primera y segunda molécula de ligando al dímero. Se muestran las ecuaciones para el ajuste de los valores de unión del radioligando (L) a los receptores que forman el dímero y para calcular el índice de cooperatividad del dímero (D_C). (Ver Franco et al., 2005, 2006; Casadó et al., 2007) para más detalles). (Extraído de Franco et al., 2006).

Nuestro grupo de investigación ha profundizado en el desarrollo del “modelo de receptores diméricos” y ha formulado ecuaciones para unión de radioligandos que tienen en cuenta las constantes macroscópicas y permiten ajustar los datos de experimentos de saturación y de competición. Estas ecuaciones permiten el cálculo de las constantes de disociación macroscópicas correspondientes a la unión de la primera molécula de ligando al dímero no ocupado (K_{D1}) y a la unión de la segunda molécula de ligando al dímero semiocupado (K_{D2}). A su vez, las ecuaciones permiten el cálculo del índice de cooperatividad (D_C) que mide el grado de cooperatividad que se produce entre la primera entrada de ligando al receptor vacío y la segunda entrada de ligando al receptor en el dímero semi-ocupado; es decir, es un parámetro que mide los cambios estructurales que ocurren en una molécula de receptor cuando el ligando se une al otro receptor en el dímero (Casadó et al., 2007, 2009).

La posibilidad de calcular las constantes de disociación de la unión de la primera molécula de ligando (K_{D1}), la de la segunda molécula de ligando (K_{D2}) al homodímero y el índice de cooperatividad (D_C), permite una cuantificación sencilla de los efectos de los reguladores alostéricos. Dichos reguladores alostéricos son moléculas naturales o sintéticas que interaccionan con un centro alostérico del receptor alterando la unión del ligando al centro ortostérico y, por consiguiente, regulando la activación del receptor. En el “modelo de receptores diméricos” o “two-state dimer receptor model”, la proteína G heterotrimérica se considera un modulador alostérico del dímero ya que se une a un centro de unión no ortostérico y puede modificar las características de unión de los centros ortostéricos en el dímero (Hepler y Gilman, 1992). El “modelo de receptores diméricos” considera que un modulador alostérico puede ser cualquier molécula que se una a un centro no ortostérico, u otra proteína que interaccione con el receptor y afecte sus características de unión, y puede modificar tanto las constantes de disociación como el índice de cooperatividad.

1.2.4. Consecuencias funcionales de la oligomerización de GPCR

La dimerización está implicada en la regulación de la funcionalidad del receptor a diferentes niveles, desde la modulación de la expresión del receptor en la superficie celular hasta el hecho de conferir nuevas propiedades farmacológicas a los receptores expresados en el oligómero. Ésto ha proporcionado una nueva perspectiva para considerar cuál es la unidad de señalización de los GPCR, así como para el desarrollo de ligandos que actúan a través de este tipo de receptores.

Aunque en muchos casos la relevancia fisiológica no se conoce completamente, diversos estudios, llevados a cabo en sistemas de expresión heterólogos, han sugerido distintos papeles funcionales para la oligomerización de GPCR (**Figura 1.7**). Por ejemplo, la oligomerización puede estar implicada en la ontogénesis de los GPCR, es decir, en el control de calidad del plegamiento y del destino a la membrana de los receptores sintetizados de *novo*. Asimismo, en algunos casos se ha observado una regulación de la formación/separación de oligómeros presentes en la membrana plasmática mediada por ligando. También se ha constatado que la oligomerización

1.Introducción

confiere diversidad farmacológica, ya que posibilita al ligando de un receptor influir en la unión de otro ligando al segundo receptor dentro del dímero (Ferré, 2007; Franco et al., 2008). La oligomerización también puede modificar las propiedades de señalización de un determinado ligando afectando a la selectividad de la interacción entre el receptor y su correspondiente proteína G, resultando en una potenciación, atenuación o acoplamiento con otra proteína G. Finalmente, también se ha demostrado que la oligomerización puede alterar el patrón endocítico para un determinado receptor (Terrillon y Bouvier, 2004).

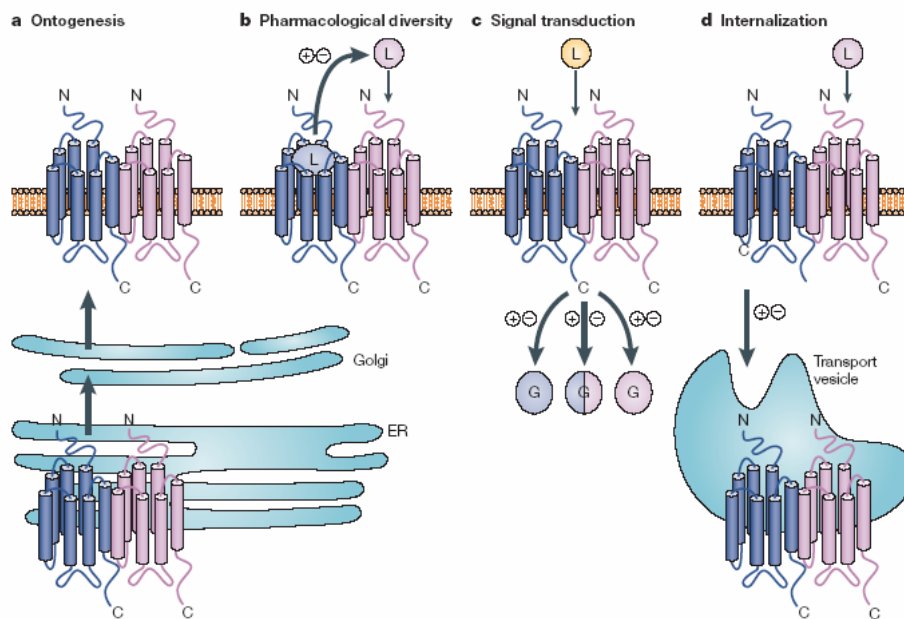


Figura 1.7. Funcionalidad de la oligomerización de los GPCR. ER, retículo endoplasmático; L, ligando. (Extraído Milligan et al., 2006)

Una de las primeras evidencias de que los oligómeros forman una unidad compleja de señalización proviene de estudios que demuestran que la disrupción del homómeros del receptor β_2 -adrenérgico, con un péptido derivado del sexto dominio transmembrana implicado en la dimerización, inhibe la producción de AMPc inducida por el agonista (Hebert et al., 1996). Estos resultados indican que el dímero es la especie activa del receptor, aunque tampoco se puede descartar la posibilidad de que el péptido esté modificando interacciones intramoleculares dentro del monómero que provocan la falta de funcionalidad, siendo la pérdida de la unidad dimérica más bien una consecuencia y no una causa de la no señalización por parte del receptor. En el mismo sentido, AbdAlla (AbdAlla et al., 2000) describe que la heterodimerización entre los

receptores de angiotensina AT₁ y B₂ de bradiquinina mejora la señalización de AT₁R, mientras que inhibe la del receptor B₂, mostrando que la heteromerización entre receptores diferentes puede ser un nuevo modelo para la modulación de la respuesta de GPCR por sus respectivos ligandos. En 2004, se demostró que los receptores de dopamina D₁ y D₂ forman heterómeros en células transfectadas (Lee et al., 2004). Los receptores D₁ están acoplados a la proteína Gs mientras que los D₂ están acoplados a la proteína Gi. Pero los heterómeros D₁R-D₂R se acoplan a una proteína G diferente, Gq/11. De hecho, cuando la dopamina activa el heterómero, no da lugar a la señalización vía PKA y AMPc sino que moviliza calcio y activa la calmodulina quinasa (Rashid et al., 2007). También se ha descrito que los receptores de adenosina A_{2A} y cannabinoides CB₁ heteromerizan y que, en dicho heterómero, es necesaria la activación del receptor A_{2A} para que el receptor CB₁ inhiba la producción de AMPc (Carriba *et al.* 2007).

1.3. Receptores de Cannabinoides

1.3.1. Sistema endocannabinoide

El cannabis, comúnmente conocido como “marihuana”, es una de las drogas de abuso más extendidas entre la población europea. Su uso intensivo se ha relacionado con diversos problemas neurológicos no específicos. En contrapunto, el sistema endocannabinoide, descubierto a partir de la identificación de las sustancias psicoactivas del cannabis, se ha puesto en el punto de mira de la sociedad en los últimos años como posible diana terapéutica para muchas enfermedades de tipo neurodegenerativo y tumoral. Si bien los efectos y propiedades terapéuticas del cannabis ya eran harto conocidos por antiguas civilizaciones, no fue hasta 1964 que se consiguió aislar el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), principal constituyente psicoactivo del cannabis, a partir de preparaciones de *Cannabis Sativa* (Mechoulam y Gaoni, 1965; Gaoni y Mechoulam, 1971) que, aún a día de hoy, se utiliza para combatir la emesis y la falta de apetito en los enfermos de cáncer. El carácter lipofílico de esta sustancia hacía pensar que ejercía sus efectos de manera inespecífica, interaccionando con los lípidos de la membrana celular. Sin embargo, unos veinte años más tarde, Howlett y colaboradores

1.Introducción

(Howlett et al., 1990) describieron centros de unión de alta afinidad para el Δ^9 -THC en membranas celulares, lo que sugirió que su acción podía estar mediada por receptores específicos. Hasta ahora, se han clonado y caracterizado inequívocamente dos de estos receptores: los CB₁ (CB₁R) y los CB₂ (CB₂R). El primer receptor de esta familia, el CB₁, se encontró a partir de un *screening* de GPCR huérfanos (Matsuda et al., 1990) y su localización fue predominantemente cerebral y testicular. El descubrimiento del segundo receptor, el CB₂, fue posterior e, inicialmente, su localización se restringió a la periferia, principalmente en el sistema inmune (Pertwee, 1997). Hoy en día se sabe que, si bien es cierta su expresión predominante en células inmunológicas, los CB₂R aparecen también en el sistema nervioso central y su acción es clave para entender ciertas enfermedades cerebrales, al mismo tiempo que supone una diana terapéutica clave en su tratamiento (Rivers y Ashton, 2010).

La identificación, caracterización y localización de receptores específicos, capaces de reconocer al Δ^9 -THC, planteó la cuestión de cuál o cuáles debían ser los ligandos endógenos capaces de interactuar con estos receptores, es decir, la posible existencia endógena de sustancias similares al Δ^9 -THC que, actuando a modo de agonistas, mimetizaran sus efectos en el organismo. Aunque en los últimos años han sido numerosos los endocannabinoides aislados, tanto de tejido nervioso como periférico, los más importantes son los derivados de eicosanoides como la anandamida (AEA) (Devane et al., 1992) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995). A partir de su identificación, se investigó la ruta bioquímica de su síntesis, liberación (Di Marzo et al., 1994; Cadas et al., 1996), transporte (Beltramo et al., 1997) y degradación (Cravatt et al., 1996). Todo ello permitió conocer con el término de “sistema endocannabinoide” a este conjunto que comprende: i) Los receptores de cannabinoides, ii) los ligandos endógenos o endocannabinoides y iii) los enzimas implicados en su síntesis y degradación. En la actualidad, este sistema aparece como un relevante modulador fisiológico, no sólo a nivel del sistema nervioso central, sino también en el periférico y en otros muchos sistemas del organismo.

Químicamente, los endocannabinoides son derivados del ácido araquidónico, conjugados con etanolamina o glicerol, y se relacionan con otros transmisores lipídicos de tipo eicosanoide, como las prostaglandinas o leucotrienos, importantes en

inflamación, dolor, comportamiento alimentario y metabolismo lipídico. La AEA es un producto del metabolismo de los fosfolípidos de la membrana y fue considerada durante algún tiempo como producto de la degradación post-mortem del cerebro en lugar de un metabolito funcional, debido a que su concentración en cerebro (de 10 a 100 pmol g⁻¹, (Kempe et al., 1996)) es casi 200 veces menor que la del 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Sugiura et al., 1995; Stella et al., 1997). El 2-AG, el éster del ácido araquidónico y el glicerol, fue aislado originalmente del intestino y del cerebro de perro (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Además de estos dos endocannabinoides principales, se han identificado otros tres hasta la fecha: El noladin éter (Hanus et al., 2001), la virodhamina (Porter et al., 2002) y la N-araquidonildopamina (NADA) (Huang y Walker, 2006).

Al contrario que los neurotransmisores o neuropéptidos clásicos, estos compuestos no se almacenan en compartimentos intracelulares, sino que se sintetizan en función de la demanda fisiológica, en el momento y lugar necesario, y son liberados por la célula a partir de ciertos precursores fosfolipídicos de la membrana por un mecanismo que no está todavía completamente determinado. Dado que son compuestos poco solubles, dependen de la localización recíproca de los lugares de producción y de sus receptores (Di Marzo, 2008). El aumento en la concentración intracelular de Ca²⁺, debido a la despolarización neuronal o a la activación de receptores glutamatérgicos, activa la liberación tanto de AEA como de 2-AG desde los terminales postsinápticos para unirse a los receptores situados, mayoritariamente, en los terminales presinápticos, pero también en los postsinápticos (Di Marzo et al., 2007).

En la vía de síntesis de la AEA intervienen principalmente dos reacciones enzimáticas. En la primera hay una transferencia de un grupo acil-graso desde la posición sn-1 de un glicerofosfolípido al grupo sn-3 de la fosfatidiletanolamina, catalizado por el enzima N-aciltransferasa (NAT) dependiente de Ca²⁺ y asociado a la membrana, formándose N-araquidonilfosfatidiletanolamina o NArPE. En una segunda fase se produce la hidrólisis de NArPE, catalizada por una fosfolipasa D selectiva (NAPE PLD), dando lugar a AEA y ácido fosfatídico. De esta manera, la NArPE ha sido considerado un almacén de AEA dependiente de Ca²⁺ (Di Marzo et al., 1996a; b; Piomelli et al., 1998) para su posterior liberación hacia el espacio sináptico. Sin

1.Introducción

embargo, la conversión final de AEA a partir de NArPE también puede darse por otras rutas enzimáticas y todavía hoy sigue siendo materia de debate (Di Marzo, 2011).

Dado que el 2-AG es un monoacilglicérido, su síntesis es diferente a la de la AEA. Los mayores precursores biosintéticos del 2-AG son los diacilgliceroles (DAG) producidos por la hidrólisis de fosfatidilinositoles de las membranas celulares por acción de una fosfolipasa C selectiva (PLC β) o a partir del ácido fosfatídico (PA) catalizado por una PA fosfohidrolasa. Los DAG se convierten posteriormente en 2-AG por la acción de lipasas selectivas (DAGL α y DAGL β) activadas por glutatión y dependientes de Ca²⁺ (Bisogno et al., 2003; Okamoto et al., 2004).

Las diferentes vías de síntesis de la AEA y el 2-AG sugieren que estos dos compuestos pueden actuar de forma independiente dentro de la célula. Esta hipótesis se encuentra corroborada, además, por tres hechos experimentales: 1.- la estimulación eléctrica de cortes de hipocampo incrementa la liberación de 2-AG pero no la de anandamida (Stella et al., 1997), 2.- la activación del receptor D₂ de dopamina en el estriado incrementa la liberación de AEA pero no la de 2-AG (Giuffrida et al., 1999; Ferrer et al., 2003) y 3.- la activación de receptores NMDA en neuronas corticales en cultivo incrementa los niveles de 2-AG sin afectar la formación de AEA, la cual requiere de la activación simultánea de receptores NMDA y α -7 nicotínicos (Stella y Piomelli, 2001). Una vez que los endocannabinoides son sintetizados se pueden unir a sus receptores en la misma célula o pueden ser liberados al fluido extracelular desde dónde pueden alcanzar otras direcciones, por ejemplo terminales presinápticos, con la ayuda de otras proteínas transportadoras como lipocalinas o albúmina (Piomelli, 2003) (**Figura 1.8**). Por otro lado, diversas observaciones apuntan a que el principal ligando endógeno para los CB₁R es el 2-AG en lugar de la AEA. Así, la distribución de 2-AG en el cerebro correlaciona con la de CB₁R, la acumulación de 2-AG y no la de AEA produce un aumento de la señal mediada por CB₁R en el cerebro, las DAGL comparten una historia evolutiva con los CB₁R, y, por último, las enzimas de síntesis y degradación de 2-AG se encuentran muy próximas a los CB₁R en varias sinapsis cerebrales (Bisogno et al., 2003; Hashimoto et al., 2007, 2008; Palomäki et al., 2007; Katona y Freund, 2008).

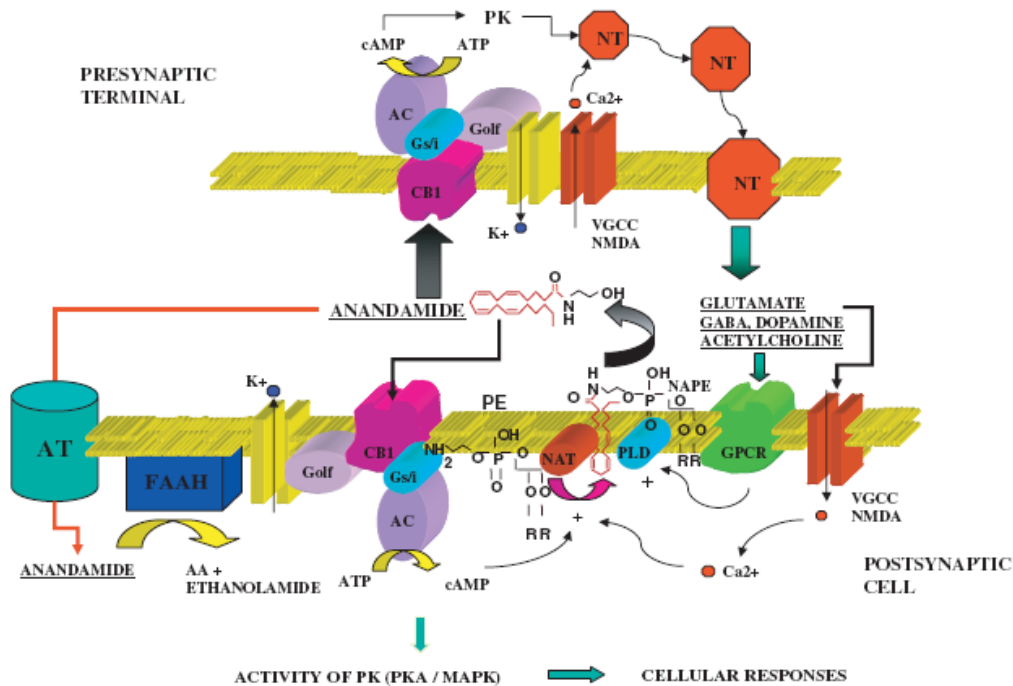


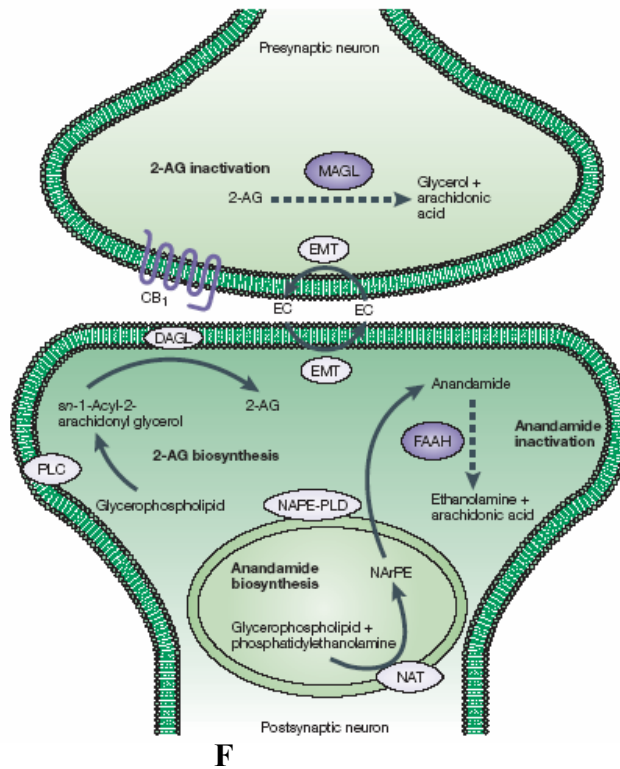
Figura 1.8. Síntesis, transporte y señalización de la anandamida. Extraído de (Rodríguez de Fonseca et al., 2005).

Por otro lado, la degradación de ambas sustancias también tiene lugar por enzimas diferentes: La AEA se metaboliza predominantemente por la amida hidrolasa de ácido graso (FAAH), mientras que el 2-AG se metaboliza fundamentalmente por la monoacilglicerol lipasa (MAGL). Sin embargo, existen evidencias de que el 2-AG también puede ser metabolizado por la FAAH y que ambos compuestos son también procesados por la ciclooxygenasa de tipo 2 (COX2) (Kozak et al., 2000, 2001, 2002, 2003, 2004). La terminación de la señal de la AEA y el 2-AG parece ser dependiente de un proceso de dos pasos que comienza con el transporte a través de la membrana plasmática seguida de su hidrólisis a ácido araquidónico y etanolamina, o glicerol, respectivamente. En el primer caso, esta hidrólisis está catalizada por la enzima FAAH (Cravatt et al., 1996), ubicua y ampliamente caracterizada, clonada, purificada y cristalizada (Bracey et al., 2002). La FAAH es una amidasa de la superfamilia de las serinas hidrolasas (Patricelli et al., 1999) que inicialmente fue encontrada en áreas perinucleares dentro del citoplasma de la célula. Felder y colaboradores han establecido varias hipótesis para describir cómo se produce el transporte de la AEA al citoplasma y si hay algún requerimiento molecular para el transporte del citoplasma a los espacios nucleares para su hidrólisis. Las hipótesis que se postulan son las siguientes: El transporte sucede por difusión simple a través de la membrana debido a su carácter

1.Introducción

lipofílico y se dirige a una localización perinuclear de FAAH para su posterior hidrólisis, o existe una FAAH asociada a la membrana con capacidad para captar e hidrolizar la anandamida, o bien la captación de anandamida tiene lugar a través de caveolas y se transporta por vía endocítica a una localización perinuclear de FAAH, o la unión de la anandamida es a través de proteínas específicas y transportadoras que facilitan su unión a la enzima FAAH asociada a la membrana (Dickason-Chesterfield et al., 2006) (**Figura 1.9**).

En cualquiera de los casos, el transporte de estas sustancias hacia el interior de la célula supone la terminación de la actividad biológica de los endocannabinoides.



F
Figura 1.9. Degradación de AEA y 2-AG.
Extraído de Di Marzo et al., 2004)

En un principio y dada la naturaleza lipofílica de los cannabinoides, se pensaba que éstos ejercían sus efectos interaccionando con la membrana plasmática, estimulando o inhibiendo enzimas asociadas y alterando el estado fisiológico de los canales. La existencia de los receptores de cannabinoides se confirmó al observar la inhibición funcional de la adenilato ciclasa tras la adición de Δ^9 -THC a células de neuroblastoma (Howlett y Fleming, 1984; Howlett, 1985). Se observó además que esta inhibición era bloqueada con toxina pertúsica (PTX), lo cual implicaba a la proteína $G_{i/o}$ en el proceso de señalización intracelular (Howlett et al., 1986). Estos hechos, pusieron de manifiesto que la mayoría de los efectos centrales de los cannabinoides estaban mediados por proteínas que actuaban como receptores de membrana. Los receptores de cannabinoides

mejor caracterizados son los CB₁R y CB₂R, en cuanto a su estructura primaria, afinidad de ligandos, propiedades y sistemas de transducción de señal. Existen indicios de la existencia de otros receptores acoplados a la proteína G, que también podrían formar parte de esta familia, como es el caso del receptor huérfano GPR55, a pesar de que sus propiedades farmacológicas, su señalización y su función celular varían con respecto a los dos anteriores, pero cuya acción mediada de los endocannabinoides podría explicar efectos fisiológicos no mediados por CB₁R/CB₂R (Ryberg et al., 2007; Pertwee, 2007; Brown y Robin Hiley, 2009; Sharir y Abood, 2010; Balenga et al., 2011). Por otro lado, el receptor vanilloide tipo 1 (TRPV1) también puede mediar algunos de los efectos de los ligandos cannabinoides (Ross, 2003, 1; Lam et al., 2005; Di Marzo y De Petrocellis, 2010).

Tanto los CB₁R como los CB₂R pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G con siete dominios transmembrana. Contienen un dominio N-terminal extracelular que posee lugares de glicosilación y un dominio C-terminal intracelular de unión a proteína G. Ambos receptores han sido clonados y existen modelos tridimensionales de organización de su estructura secundaria en humano y en ratón (Bramblett et al., 1995; Onaivi et al., 1996; Xie et al., 2003).

1.3.2. Receptor de cannabinoides CB₁

El cDNA de los CB₁R fue aislado por primera vez de una librería de corteza cerebral de rata. El locus del gen en humanos se ha localizado en el cromosoma 6 en la posición 6q14-q15 (Caenazzo et al., 1991; Hoehe et al., 1991). La proteína codificada posee una alta homología en nucleótidos y aminoácidos entre humanos y roedores. Pertenecen a la familia A de los GPCRs, aunque difiere de este grupo en que no presenta el puente disulfuro en el EC2 ni el residuo de prolina en el TM-5. Puede presentar hasta tres lugares de glicosilación, de tal manera que su peso puede variar hasta en 10kDa.

Como GPCR, los CB₁R se pueden unir tanto a proteína G_i como G_o a través del extremo carboxi-terminal. Los aminoácidos más próximos a la membrana de esta región son decisivos para el acoplamiento de la proteína G_{i/o}, mientras que los más distales

1.Introducción

modulan la amplitud y la cinética (Nie y Lewis, 2001a; b). La cola C-terminal está implicada, también, en procesos de desensibilización e internalización. De esta manera, los aminoácidos de la zona central del extremo carboxi-terminal contienen residuos fosforilados necesarios para la desensibilización mediada por quinasas específicas (GRK) y arrestinas (Jin et al., 1999), mientras que cuatro residuos del final de la cola son importantes en la internalización (Hsieh et al., 1999). La unión a la proteína G de estos receptores en los terminales presinápticos da lugar a una inhibición de la adenilato ciclasa, disminuyendo así la producción de cAMP; si bien esto puede variar en función del receptor con el que heteromericen. Así pues, se observó que, en presencia de los receptores de dopamina D₂, los CB₁R se unen a la proteína G_s estimulando la producción de AMPc (Glass y Felder, 1997; Jarrahian et al., 2004; Kearn et al., 2005).

Los CB₁R están implicados, además, en otras vías de señalización, dependiendo de las células en las que se encuentren, estimulando a las quinasas activadoras de mitógenos (MAPK) tales como ERK 1/2, p38 y c-Jun (JNK), la vía de PI3K/Akt, además de la expresión de genes tempranos (ej. Krox-24) (Bouaboula et al., 1999; Molina-Holgado et al., 2002; Graham et al., 2006; Turu y Hunyady, 2010). Los CB₁R pueden estimular canales iónicos indirectamente a través del AMPc, favoreciendo la corriente de salida de potasio de los canales tipo-A y directamente, a través de las proteínas G_{i/o} e independientemente de AMPc, acoplándose a canales de potasio rectificadores de la corriente interna (GIRK) y actuando negativamente sobre los canales dependientes de voltaje de calcio tipo L, N y P/Q (Howlett y Mukhopadhyay, 2000; McAllister y Glass, 2002; Turu y Hunyady, 2010). La desensibilización de CB₁R se ha descrito mediada por un mecanismo de internalización a través de la acción de β -arrestinas (Jin et al., 1999; Kouznetsova et al., 2002; Breivogel et al., 2008; Daigle et al., 2008). Todos estos mecanismos de señalización pueden mediar los efectos de los cannabinoides como reguladores de la liberación de neurotransmisores. De esta manera, los endocannabinoides funcionan como mensajeros retrógrados cuando sus receptores diana se encuentran en la membrana presináptica, inhibiendo la liberación de glutamato (Shen et al., 1996), GABA (Szabo et al., 1998), acetilcolina (Gifford et al., 1997), noradrenalina (Schlicker et al., 1997a) y serotonina (Nakazi et al., 2000). En las sinápsis glutamatérgicas, por ejemplo, los receptores ionotrópicos de glutamato como AMPA o NMDA se encuentran en la densidad postsináptica (PSD) uniendo el glutamato liberado

por el terminal presináptico en un mecanismo dependiente del Ca^{2+} . Cuando la liberación es elevada, por un aumento excesivo del Ca^{2+} intracelular, la alta concentración de glutamato en la hendidura sináptica activa a los mGluR asociados a la maquinaria perisináptica (PSM) que activan a la $\text{PLC}\beta$, a través de la proteína Gq11 y la proteína homer, y producen la liberación de 2-AG a partir de los fosfatidinosoles de la membrana. El 2-AG liberado en el terminal postsináptico se unirá entonces a los receptores presinápticos inhibiendo la entrada de calcio en el terminal (Katona y Freund, 2008) (**Figura 1.10**).

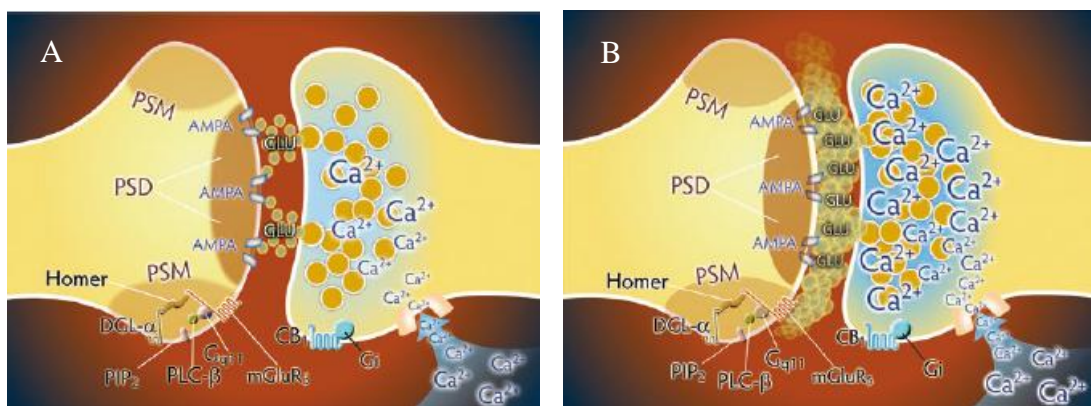


Figura 1.10. Activación de la señalización retrógrada mediada por endocannabinoides. A) Actividad basal de la entidad sináptica glutamatérgica que implica a los receptores ionotrópicos de glutamato AMPA y NMDA en la densidad postsináptica (PSD). B) Activación de los receptores mGlu en la maquinaria de señalización perisináptica (PSM) por un exceso en la liberación de glutamato. Extraído de (Katona y Freund, 2008).

El sistema cannabinoide es especialmente relevante en las funciones cognitivas y emocionales; está implicado en circuitos neuronales del corteza, hipocampo y amígdala y en la adicción a drogas en el sistema mesolímbico mediante mecanismos de modulación sináptica que incluyen DSI (*Depolarization-Induced Supression of Inhibition*), en neuronas GABAérgicas, y DSE (*Depolarization-Induced Supression of Excitation*), en neuronas glutamatérgicas (Parolaro y Rubino, 2002; Gerdeman y Lovinger, 2003; Laviolette y Grace, 2006). Aunque la activación presináptica de los CB $_1$ R casi siempre conlleva una disminución en la liberación del neurotransmisor (Freund et al., 2003a), la magnitud de su acción se puede dividir en dos mecanismos diferentes con respecto a su potencia y su implicación patofisiológica: La depresión a corto plazo o *short-term depression* (STD) y la depresión a largo plazo o *long-term*

1.Introducción

depression (LTD). Mientras la primera es de corta duración (menos de un segundo) y rápida aparición, la segunda, por estimulación prolongada de los receptores de CB₁, es de aparición más tardía y suele durar varias horas (Chevaleyre et al., 2006; Mackie, 2008; Katona y Freund, 2008; Sidhpura y Parsons, 2011).

Los CB₁R son unos de los receptores neuronales más abundantes en el cerebro de mamíferos. De hecho, son considerados los GPCR más abundantes del CNS. La distribución regional de los CB₁R ha sido caracterizada en el cerebro humano y de rata en correlación con los efectos de los cannabinoides en el comportamiento como el humor, la coordinación motora, funciones autonómicas, aprendizaje y memoria, percepción sensorial y mecanismos del dolor, entre otros (Glass et al., 1997; Herkenham et al., 1990, 1991cb; a; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Westlake et al., 1994; Valverde, 2005). Aunque la microscopía electrónica puso de manifiesto una localización predominantemente presináptica para los CB₁R (Katona et al., 1999; Marsicano y Lutz, 1999; Tsou et al., 1999), se han localizado también en algunas estructuras postsinápticas y en células gliales (Rodríguez et al., 2001; Köfalvi et al., 2005). A nivel postsináptico, los CB₁R modulan el potencial de acción actuando sobre canales de K⁺ rectificadores y canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, disminuyendo la excitabilidad neuronal. En general, se ha observado una disminución de la expresión de estos receptores en cerebro, tanto de humanos como roedores, durante procesos de dolor (Westlake et al., 1994).

En cuanto a la distribución en el sistema nervioso, los CB₁R se encuentran en alta densidad, tanto en sinápsis glutamatérgicas como gabaérgicas, en hipocampo, amígdala, hipotálamo, algunas regiones olfatorias, en interneuronas o neuronas de proyección de los ganglios basales: caudado-putamen (estriado dorsal), núcleo accumbens (estriado ventral), sustancia nigra pars reticulata (SNr) y globo pálido; en cerebelo y médula espinal. De forma más moderada se pueden encontrar también en corteza y tálamo (Glass et al., 1997; Herkenham et al., 1990, 1991cb; a; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Westlake et al., 1994; Farquhar-Smith et al., 2000; Svízenská et al., 2008) (**Figura 1.11**).

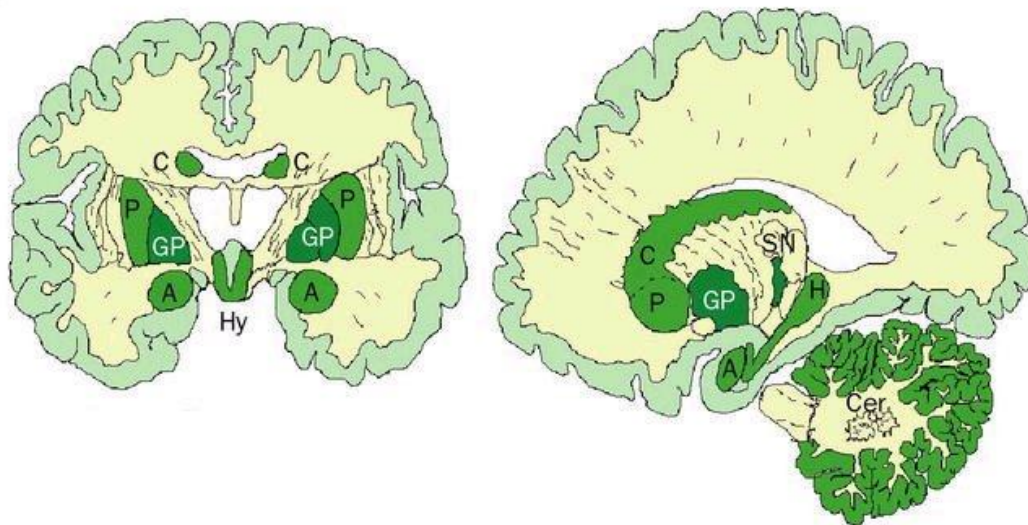


Figura 1.11. Distribución de los CB₁R en el sistema nervioso de mamíferos. La concentración de CB₁R es mayor (verde intenso) en globo pálido (GP), y sustancia negra (SN); alta pero algo menor en cerebelo (Cer), hipocampo (H), núcleo caudado (C), putamen (P), hipotálamo (Hy), y amígdala (Am); moderada en la corteza y baja en la sustancia blanca (amarillo). (Extraído de Baker et al., 2003).

La expresión del receptor en hipocampo se ha relacionado con los efectos de los cannabinoides en la memoria y cognición (Herkenham et al., 1990, 1991a). Se ha determinado que la exposición crónica del Δ^9 -THC o extractos de marihuana altera las funciones y estructuras del hipocampo implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje en mamíferos (Scallet, 1991). La aparición de CB₁R en los ganglios basales y los efectos de los cannabinoides en estas estructuras indican que los endocannabinoides podrían tener un papel importante en la regulación de las funciones motoras. De hecho, existen varios estudios que describen anomalías en la expresión o en la unión de ligandos para estos receptores en desórdenes neurológicos del sistema extrapiramidal. Es decir, la unión de los endocannabinoides a los CB₁R disminuye en las enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson o Huntington (Glass et al., 1993; Richfield y Herkenham, 1994; Sañudo-Peña et al., 1998; Fernández-Ruiz y Gonzáles, 2005; Katona y Freund, 2008).

La estimulación de los CB₁R en el núcleo accumbens activa el circuito de recompensa dopaminérgico y, por tanto, la motivación para comer, fumar o tomar

1.Introducción

drogas de abuso. Los receptores localizados en el area tegmental ventral (VTA), en las terminaciones GABAérgicas, actúan como moduladores retrógrados que inhiben los input hacia la neuronas dopaminérgicas del VTA, lo que activaría el circuito de recompensa (Maldonado et al., 2006). Las microinyecciones de Δ^9 -THC en el VTA posterior y en la parte posterior de núcleo accumbens producen, así mismo, el refuerzo de los efectos de drogas como anfetaminas, cocaína, heroína, y nicotina, dónde se piensa que tienen la acción de recompensa (Valverde et al., 2000; Castañé et al., 2002; Zangen et al., 2006). De esta manera, se ha propuesto que los antagonistas de este receptor resultarían eficaces en el tratamiento de la drogadicción (Maldonado et al., 2006). En el cerebelo de rata, se ha detectado una elevada expresión de CB₁R (Matsuda et al., 1993) que implica a estos receptores en los problemas de ataxia, inmovilidad y catalepsia, observados experimentalmente tras la administración de HU-210 (Martín-Calderón et al., 1998). Sin embargo, la densidad de CB₁R en el cerebelo humano es bastante más baja, lo cual es consistente con efectos menos agudos en el control motor humano tras la administración de marihuana (Ameri, 1999; Herkenham et al., 1990).

Además de su importancia en el CNS, los CB₁R también se encuentran presentes en el sistema nervioso periférico dónde regulan la percepción del dolor en varios órganos como el bazo, amígdalas, corazón, próstata, útero, ovarios, testículos y tejidos gastrointestinales (Farquhar-Smith et al., 2000; Iversen y Chapman, 2002). En estos últimos también juegan un papel importante en la regulación de la ingesta, acumulación de grasa y metabolismo lipídico y glucolítico. La estimulación hipotalámica de los CB₁R, a través de neuropéptidos, regula la homeostasis energética, la ingesta y la lipogénesis en tejidos viscerales (Cota et al., 2003). La actividad de los CB₁R en el CNS también se ha visto incrementada por niveles altos de leptina liberada desde el tejido adiposo (Pagotto y Pasquali, 2005).

Existen distintos tipos de agonistas capaces de inducir diferentes cascadas de señalización (Pertwee, 1997; McAllister y Glass, 2002; Di Marzo, 2002; Piomelli, 2003; De Petrocellis et al., 2004). Se han establecido cuatro familias de agonistas para los receptores de cannabinoides: los ligandos clásicos, entre los que se incluye al HU-210, cuya estructura es similar a la del THC, los no-clásicos como el CP-55,940, los cuales carecen del anillo de pirano, y los de la familia de aminoalquilindoles como el WIN

55,212-2, que se unen a un centro de unión diferente al de los otros agonistas y finalmente, se encuentran los de la familia de eicosanoides, como el ACEA, con una estructura más similar a los endocannabinoides.

1.3.3. Heteromerización de los receptores CB₁

Una de las características de los CB₁R es su capacidad para homo- y heteromerizar con otros GPCR (Randall et al., 2002). En este sentido, se había demostrado la interacción funcional entre los sistemas dopaminérgico y endocannabinoide, ya que la administración de quinpirole (agonista selectivo de los receptores de dopamina D₂-like), en el estriado dorsal de rata, aumentaba la liberación de AEA (Giuffrida et al., 1999). Posteriormente, se determinó la colocalización de estos receptores en varias subpoblaciones neuronales: estriado, tubérculo olfatorio e hipocampo (Hermann et al., 2002). En el estriado, ambos receptores están presentes en las neuronas de proyección gabaérgicas estriatopalidales, lo que sugería que estas dos proteínas podían interactuar afectando su función fisiológica. De forma individual, ambos receptores inhiben a la adenilato ciclasa (Meschler y Howlett, 2001) pero, por el contrario, cuando se co-expresan en cultivos de neuronas estriatales cambia el acoplamiento de la proteína G_{i/o} a la G_s aumentando la actividad de la adenilato ciclasa (Jarrahian et al., 2004). Estos hechos sugerían, contundentemente, la formación de heterómeros. En el año 2005, mediante experimentos de coimmunoprecipitación en líneas celulares (Kearn et al., 2005) y, posteriormente, mediante técnicas de transferencia de energía como FRET (Marcellino et al., 2008), se puso de manifiesto esta heteromerización.

Por otro lado, se había demostrado que los receptores de adenosina A_{2A} y los CB₁R codistribuían en varias áreas del CNS como estriado, cerebelo, hipocampo y corteza (Herkenham et al., 1991c; Svenningsson et al., 1999), y que ambos estaban implicados en la modulación de procesos como nocicepción, ansiedad, agresividad, actividad motora y adicción (Fredholm et al., 2003; Piomelli, 2003). Posteriormente, nuestro grupo de neurobiología molecular demostró que el efecto motor profundo que ejercen los cannabinoides depende de interacciones físicas y funcionales entre los receptores de adenosina A_{2A} y CB₁R localizados en el estriado. De acuerdo con esto, el

bloqueo de los receptores A_{2A} contrarrestaba el efecto motor depresor producido por administración intraestriatal de un agonista de CB_1R (Carriba et al., 2007). La introducción de la técnica de SRET, que combina de forma secuencial las técnicas de transferencia de energía por resonancia BRET y FRET, o la combinación de técnicas de complementación molecular fluorescente y transferencia de energía, han permitido demostrar interacciones moleculares de los tres receptores D_2 , CB_1 y A_{2A} , al mismo tiempo, en células cotransfectadas y en el estriado. Se ha sugerido que este trímero puede estar implicado en la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica (Carriba et al., 2008; Navarro et al., 2008).

Se han descrito, también, otros heterómeros de los CB_1R que pueden verse comprometidos en eventos fisiológicos muy diversos. En este sentido, se ha descrito la formación de heterómeros con el receptor de angiotensina (AT_1). Los heterómeros AT_1R - CB_1R incrementan su expresión en células hepáticas de ratas administradas con etanol. En estas células, el bloqueo de los CB_1R impide la señalización por mitógenos mediada por la angiotensina y la expresión de genes profibrogénicos (Rozenfeld et al., 2011). Mediante técnicas de FRET y coinmunoprecipitación, se ha demostrado la interacción molecular entre CB_1R y el receptor opioide μ_1 (Hojo et al., 2008). Ambos receptores co-localizan en los mismos terminales presinápticos, señalizan a través de las mismas vías mediadas por proteína G e interaccionan funcionalmente modulando comportamientos de adicción y alcoholismo (López-Moreno et al., 2010; Spano et al., 2010). Recientemente, también se ha descrito que la heterodimerización entre los receptores de orexina OX_1 y los CB_1R da lugar a un crosstalk negativo en la fosforilación de ERK 1/2 en células cotransfectadas (Ellis et al., 2006; Ward et al., 2011).

1.3.4. Receptor de cannabinoides CB_2

Al tiempo que ya estaba consolidada la idea de que los CB_1R se expresaban predominantemente en el cerebro y en algunos tejidos periféricos, la expresión de los CB_2R se relegaba a tejidos periféricos con expresión predominante en células del sistema inmune (Munro et al., 1993). La identificación definitiva y caracterización funcional de los CB_2R neuronales sigue siendo, a día de hoy, una cuestión controvertida, a pesar de que cada vez son más las evidencias de su expresión encefálica. Onaivi y sus

colaboradores han sido pioneros en identificar y caracterizar los CB₂R en el cerebro (Onaivi et al., 2006). Si bien persiste la idea de que los CB₁R, por su abundancia y ubicuidad, son la principal diana de acción de los cannabinoides en el sistema nervioso central, existen evidencias de que no todas las acciones de los cannabinoides son mediadas por este receptor y que, probablemente, algunas puedan ser atribuidas a los CB₂R, o incluso otro tipo de receptores capaces de mediar los efectos neuronales de los cannabinoides como el receptor huérfano GPR55 (Ryberg et al., 2007; Pertwee, 2007; Sharir y Abood, 2010) o el receptor vanilloide (Szolcsányi, 2000; Smart y Jerman, 2000; Pertwee y Ross, 2002). A pesar de que varios grupos no han sido capaces de demostrar la presencia de CB₂R en el cerebro (Derocq et al., 1995; Galiègue et al., 1995; Schatz et al., 1997; Griffin et al., 1999; Sugiura y Waku, 2000; Carlisle et al., 2002), otros, sin embargo, han determinado su expresión en células microgliales de rata (Carrier et al., 2004) y humanas (Núñez et al., 2004), en procesos de inflamación de pacientes postmortem con enfermedad de Alzheimer (Benito et al., 2003; Pazos et al., 2004; Fernández-Ruiz et al., 2007), en células granulares del cerebelo (Skaper et al., 1996) o en astrocitos humanos (Sheng et al., 2005), entre otras localizaciones. Dada la expresión de los CB₂R durante los procesos de neuroinflamación o enfermedades neurológicas, se pensó que su presencia en el cerebro estaba asociada a procesos patológicos, incrementándose su expresión en células gliales pero no neuronales. Sin embargo, usando estrategias *in vivo* e *in vitro*, se ha logrado detectar su expresión en cerebros sanos en los últimos años (Onaivi et al., 2006), en progenitores neurales (Palazuelos et al., 2006, 2012), en células oligodendrogliales (Molina-Holgado et al., 2002) e incluso en algunas subpoblaciones neuronales de mamíferos no primates (Ross et al., 2001; Wotherspoon et al., 2005; Van Sickle et al., 2005; Ständer et al., 2005; Palazuelos et al., 2006; Brusco et al., 2008a; Chin et al., 2008; Viscomi et al., 2009). La presencia neuronal de CB₂R se ha relacionado con su posible implicación en depresión, esquizofrenia y dependencia o abuso de drogas (Onaivi, 2006; Ishiguro et al., 2007; Onaivi et al., 2008, 2011). Diversos análisis inmunohistoquímicos han revelado marcaje neuronal y glial en varias áreas del cerebro de rata. El marcaje más notable se ha encontrado en las células de Purkinge y en las células piramidales del hipocampo. También se ha detectado inmunoreactividad en el núcleo olfatorio anterior, en las neuronas del piriforme orbital, visual, y corteza auditiva, dónde se encuentran especialmente marcados los cuerpos y las dendritas apicales de las neuronas piramidales

1.Introducción

en las capas III y V; en el estriado, amígdala, en los cuerpos celulares del núcleo talámico y en las fibras del núcleo talámico reticular, la sustancia gris periacueductal (PAG), sustancia nigra pars reticulata, en otras estructuras del tronco cerebral y en la glándula pineal. La inmunoreactividad de los CB₂R también se ha detectado *in vitro* en cultivos de células hipocámpicas y pinealocitos de rata (Núñez et al., 2004; Van Sickle et al., 2005; Onaivi et al., 2006; Gong et al., 2006; Koch et al., 2008). Recientemente, también se ha descrito inmunoreactividad en fibras nerviosas dermales mielinizadas, fascículos pequeños subepidermales de fibras no mielinizadas y fibras nerviosas de piel humana (Ständer et al., 2005). Mediante hibridación *in situ*, no se ha podido detectar CB₂R en la raíz del ganglio dorsal (DRG) intacto (Hohmann y Herkenham, 1999) ni tampoco en los ganglios trigeminales (Price et al., 2003) pero si en las neuronas DRG de ratas neonatales cultivadas *in vitro* (Wotherspoon et al., 2005). Mediante estudios de RT-PCR, se ha detectado que el mRNA de CB₂R era 100 veces mayor en el bazo que en el cerebro de rata. Además, la expresión comparada entre los transcritos de los genes de CB₁R y CB₂R en el cerebro de ratón mostró que la expresión de CB₁R era 100 veces mayor que la de CB₂R en el tronco del encéfalo (Onaivi et al., 2006).

A diferencia de los CB₁R, la distribución subcelular de CB₂R es principalmente postsináptica en neuronas de la corteza, hipocampo y de la sustancia nigra, determinada mediante microscopía electrónica. (Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Brusco et al., 2008a; b)

Los CB₂R fueron clonados por primera vez en 1993 (Munro et al., 1993). El gen CNR2 está localizado en el cromosoma 1p36 en humanos y codifica una proteína de 360 aminoácidos con un 44% de homología con la secuencia aminoacídica de CB₁R y un 68% de identidad en los dominios de unión a ligandos. Existen evidencias de diferencias significativas en cuanto a estructura génica, tamaño de mRNA, estructura peptídica y farmacología dentro de los CB₂R de distintas especies como humana, ratón y rata (Munro et al., 1993; Brown et al., 2002). Aunque la estructura genética y los lugares de inicio de transcripción del receptor humano todavía no han sido completamente caracterizados (Abood, 2005; Onaivi, 2006), recientemente se ha descrito la existencia de un nuevo promotor en el gen CNR2 humano que codifica para una isoforma específica de testículo (CB_{2A}R), y está localizado 45kb arriba del promotor codificante para la isoforma predominante en bazo (CB_{2B}R) (Liu et al.,

2009). Las diferentes isoformas son específicas de tejido: la isoforma CB_{2A}, específica de testículos, tiene una expresión en cerebro mayor que la isoforma CB_{2B}, dominante en bazo, la cual se expresa preferentemente en tejidos periféricos excepto testículos.

La farmacología de los CB_{2R} es similar a la de los CB_{1R}, ya que muchos agonistas que se unen a CB_{1R} también son capaces de unirse a CB_{2R} aunque con afinidades diferentes (Pertwee, 2005; Fernández-Ruiz et al., 2007). Esto ocurre también para el caso de los endocannabinoides, de tal manera que la AEA es un agonista menos afín para CB_{2R} que para el CB_{1R} (Mechoulam y Hanus, 2000; Sugiura et al., 2006), excepto en condiciones patológicas (Eljaschewitsch et al., 2006). Por el contrario, el 2-AG parece ser el agonista endógeno de CB_{2R} (Sugiura et al., 2006). Esta disparidad es consistente con la disparidad en la estructura química de los agonistas, y ha sido consecuentemente aplicada para el diseño de agonistas selectivos para los CB_{2R}. Así sucede con JWH133 y sus análogos (Huffman, 2005), HU-308 (Hanus et al., 1999) y AM1241 (Malan et al., 2001), que activan selectivamente los CB_{2R}. Estos compuestos son de especial interés en el campo clínico, dado que evitarían los efectos psicoactivos de los agonistas que actúan a través de CB_{1R} y mediarían los efectos beneficiosos de los cannabinoides en numerosas enfermedades neurológicas, desde el dolor neuropático hasta procesos de neuroinflamación en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Huntington o Parkinson, dónde, además, se ha visto que los CB_{2R} pueden tener un papel neuroprotector retrasando o impidiendo el daño neuronal (Malan et al., 2001, 2; Fernández-Ruiz et al., 2008; Pazos et al., 2008; Palazuelos et al., 2009; Little et al., 2011).

En lo que se refiere a su estructura, los CB_{2R} son, también, receptores de siete hélices transmembrana pertenecientes a la familia de los GPCR (Howlett, 2002). Al igual que los CB_{1R}, se acoplan a la proteína G_{i/o} y su activación está asociada con la inhibición de la adenilato ciclasa y la ruta del AMPc/PKA (Howlett, 2002), la estimulación de la cascada de proteínas quinasas activadoras de mitógenos (MAPK), específicamente ERK 1/2 (Carrier et al., 2004; Palazuelos et al., 2006) y la cascada de p38 (Gertsch et al., 2004). La estimulación de CB_{2R} también se relaciona con la ruta de la PI3K /Akt y mTOR, (Molina-Holgado et al., 2002; Samson et al., 2003; Palazuelos et al., 2006, 2012) la cual se ha asociado con los efectos de supervivencia y proliferación celular mediada por cannabinoides, pero también con la síntesis de

1.Introducción

ceramida y su capacidad proapoptótica en células tumorales (Sánchez et al., 2001; Carracedo et al., 2006; Blázquez et al., 2006) (**Figura 1.12**).

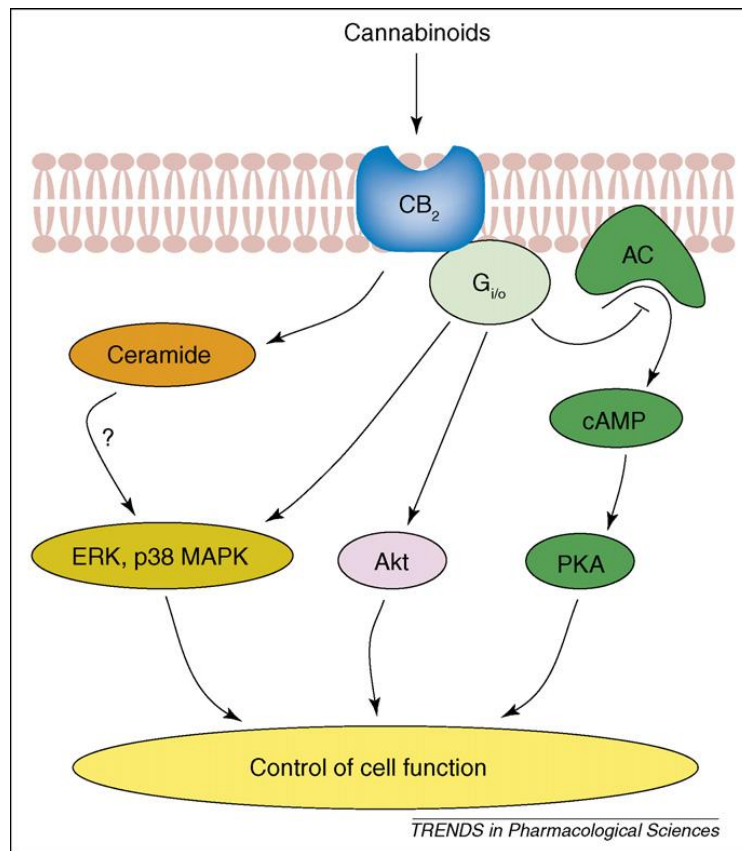


Figura 1.12 Rutas de señalización acopladas a los CB₂R. Extraído de Fernández-Ruiz et al., 2007)

La expresión de los CB₂R se incrementa en procesos inflamatorios asociados a Alzheimer (Benito et al., 2003) o en ratas modelo de la enfermedad de Huntington (Sagredo et al., 2009). Su activación, en procesos isquémicos, reduce la excitotoxicidad produciendo una disminución en la liberación de moléculas proinflamatorias en células microgliales y astrocitos, tales como NO, IL-1, IL-6 y TNF- α (Molina-Holgado et al., 2002; Fernández-Ruiz et al., 2007, 2008) (**Figura 1.13**). También puede aumentar la actividad de ERK 1/2 induciendo la migración de células del sistema inmune y generando cambios en la expresión de genes. Por otro lado, la activación de CB₂R en gliomas o astrocitomas puede inducir la apoptosis mediada por la síntesis *de novo* de ceramida activando la vía proapoptótica p8-ATF4-CHOP-TRB3 (Guzmán, 2003; Carracedo et al., 2006).

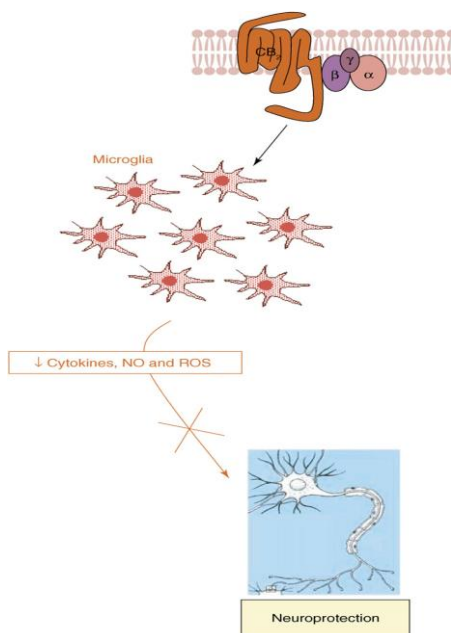


Figura 1.13. Propiedades antiinflamatorias mediadas por CB₂R. Extraído de (Fernández-Ruiz et al., 2007)

Los CB₂R se han visto implicados en proliferación en células microgliales y neuronales (Carrier et al., 2004; Palazuelos et al., 2006) y se ha sugerido que su expresión puede favorecer un estado proliferativo y no diferenciado. De hecho, existe una relación inversa entre su expresión y el estado de diferenciación celular, constituyendo, por ende, una marca de des-diferenciación de la célula que lo expresa (Molina-Holgado et al., 2007; Fernández-Ruiz et al., 2007; Palazuelos et al., 2012). Sin embargo, la activación del receptor en células tumorales induce la

apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral (Guzmán, 2003). De esta manera, los CB₂R podrían, por un lado, favorecer la supervivencia celular de las células sanas mediante acciones anti-inflamatorias dependientes de la glia y, por otro lado, dada su actividad antioncogénica, promover la apoptosis de células tumorales.

1.4. Sistema endocannabinoide y desarrollo neuronal

Todos los componentes del sistema endocannabinoide: sus receptores, ligandos y enzimas de síntesis y degradación, han sido detectados en los primeros estadios embrionarios y durante el desarrollo pre- y postnatal, lo que sugiere un papel relevante de este sistema en el desarrollo y la supervivencia (Fride, 2008). La presencia de los endocannabinoides y sus receptores en zonas atípicas cerebrales han implicado a este sistema en procesos fundamentales durante el desarrollo neural, tales como la

neuritogénesis, formación de la glía, migración neuronal, elongación axonal y fasciculación (Berghuis et al., 2007; Fernández-Ruiz et al., 2000, 2004; Harkany et al., 2007; Mulder et al., 2008).

Los endocannabinoides están presentes desde el desarrollo temprano. Aunque inicialmente la AEA se encuentra a concentraciones mucho más bajas que el 2-AG (Fernández-Ruiz et al., 2000), va incrementando sustancialmente a lo largo del desarrollo. mientras que el 2-AG se mantiene más o menos constante, excepto por un pico de producción determinado en ratas, justo un día después del nacimiento (Berrendero et al., 1999).

1.4.1. Receptores de cannabinoides en el desarrollo

Mediante hibridación *in situ* en cerebro de rata, se ha detectado el mRNA de CB₁R y CB₂R alrededor del día 11-13 de gestación. Concretamente, los CB₁R se detectaron durante los primeros estadios en algunas células del tubo neural y posteriormente, alrededor de los días 15 y 20, en varias estructuras dentro del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico (Buckley et al., 1998). Tras el nacimiento, el mRNA de los CB₁R aumenta gradualmente por todo el cerebro (McLaughlin y Abood, 1993; Rodríguez de Fonseca et al., 1993). En el embrión humano, estudios de autorradiografía permitieron discernir un patrón similar, detectándose CB₁R alrededor del día 14 de gestación y, aumentando progresivamente entre el período fetal y el adulto, en corteza frontal, hipocampo, ganglios basales y cerebelo. La mayor densidad de unión se encontró en el tracto piramidal, brachium conjunctivum, y la zona germinativa subventricular (Biegon y Kerman, 2001; Mato et al., 2003).

En la zona subventricular (SVZ), donde tienen lugar los principales procesos de neurogénesis en el adulto, se ha determinado un papel relevante en proliferación para los CB₂R. Concretamente, los antagonistas de CB₂R inhiben la proliferación de células neurales proliferativas *in vitro* e *in vivo*, en animales jóvenes, mientras que los agonistas de CB₂R favorecen la proliferación *in vivo*, siendo dicho efecto más pronunciado cuanto

mayor es la edad del animal. De esta manera, los CB₂R parecen estar relacionados con procesos de neurogénesis asociados con la edad (Palazuelos et al., 2006; Molina-Holgado et al., 2007; Goncalves et al., 2008). Esta inducción de proliferación mediada por CB₂R es dependiente de la señalización vía mTOR en cortes corticales de embriones de rata y en progenitores neurales hipocampales (Palazuelos et al., 2012). Finalmente, el tratamiento crónico con el cannabinoide sintético HU210, que muestra mayor afinidad para CB₂R que para CB₁R, produce efectos neurogénicos en el hipocampo, tanto de embriones como de animales adultos (Jiang et al., 2005).

1.4.2. *Xenopus laevis* como modelo de desarrollo embrionario

No es casualidad que la rana *Xenopus laevis* sea uno de los modelos más utilizados en biología del desarrollo. El gran tamaño de sus ovocitos, de casi 1mm de diámetro, y la accesibilidad de los mismos son unas de las características más representativas de sus muchas ventajas, pues permiten su manipulación y fertilización *in vitro*. De cada hembra se pueden obtener hasta casi 1500 embriones que, además, crecen con bastante rapidez, son fácilmente manipulables y resisten la microinyección *in vitro*. Estas características determinan su utilización para el estudio de proteínas exógenas, dado que se puede introducir fácilmente RNA externo por microinyección, ya sea en el ovocito, para el estudio de proteínas de membrana por electrofisiología u otras técnicas de biología molecular, o en el embrión temprano, en el estadio de blastómero, para estudiar los cambios que produce la expresión de la proteína en uno de los lados del organismo durante su desarrollo. Estos experimentos se denominan *estudios de ganancia de función*, debido a que se realiza un incremento en la expresión de la proteína en cuestión, microinyectando el mRNA maduro. Por el contrario, también se pueden realizar *estudios de pérdida de función* microinyectando un oligo de RNA de tipo morfolino, capaz de unirse al RNA endógeno, y silenciar la traducción de la proteína. Los cambios morfológicos, celulares o moleculares, en ambos casos, se pueden estudiar posteriormente por diversas técnicas bioquímicas y de biología molecular.

1.Introducción

Los huevos de *Xenopus* tienen un eje asimétrico dividido en dos polos, por un lado una región oscura y pigmentada, el polo animal, y por otro, el polo vegetal, de color lechoso y más denso que el anterior. Una vez fertilizado, el huevo se divide sincronizadamente por la acción de reguladores maternos tales como ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, dando lugar a una masa esférica de células sin cavidad interna denominada mórula que, posteriormente, dará lugar a la blástula, que desarrolla una cavidad interna rellena de fluido (**Figura 1.14**). La morfología y simetría radial del embrión se mantienen hasta la blástula tardía. Tras la aparición de la transcripción zigótica en la blástula media, se establece un centro de señalización, el organizador Spemann, en el lado dorsal del embrión. Las células comienzan a migrar y extenderse desde él, en el blastoporo, para formar tres capas durante el proceso conocido como gastrulación: la capa más externa, denominada ectodermo, la más interna, endodermo, y el mesodermo que se encuentra entre las dos anteriores. Las células de las diferentes capas interactúan entre ellas durante la inducción primaria para comenzar la diferenciación. Cuando la gastrulación concluye, le sigue el proceso de neurulación, durante el cual se forma el tubo neural que se convertirá en el futuro sistema nervioso central. Un conjunto de células mesodérmicas, en la parte más dorsal del embrión, dará lugar a un nuevo centro de señalización denominado notocorda. La parte ectodérmica sobre la notocorda se denomina placa neural, a cada lado se forman los pliegues neurales que inician la invaginación de la misma al tiempo que el embrión se va alargando en el eje antero-posterior. Para la completa formación del tubo neural, dichos pliegues han de cerrarse en la línea media y fusionarse bajo la epidermis. Es entonces cuando las células de la cresta neural, desde la parte de arriba del tubo neural, se desprenden hacia cada uno de los lados de la línea de fusión, y migran por todo el cuerpo dando lugar a una serie de estructuras diferenciales (Nieuwkoop, 1994; Johnson y Raven, 2002; Gilbert, 2005) (**Figura 1.14**).

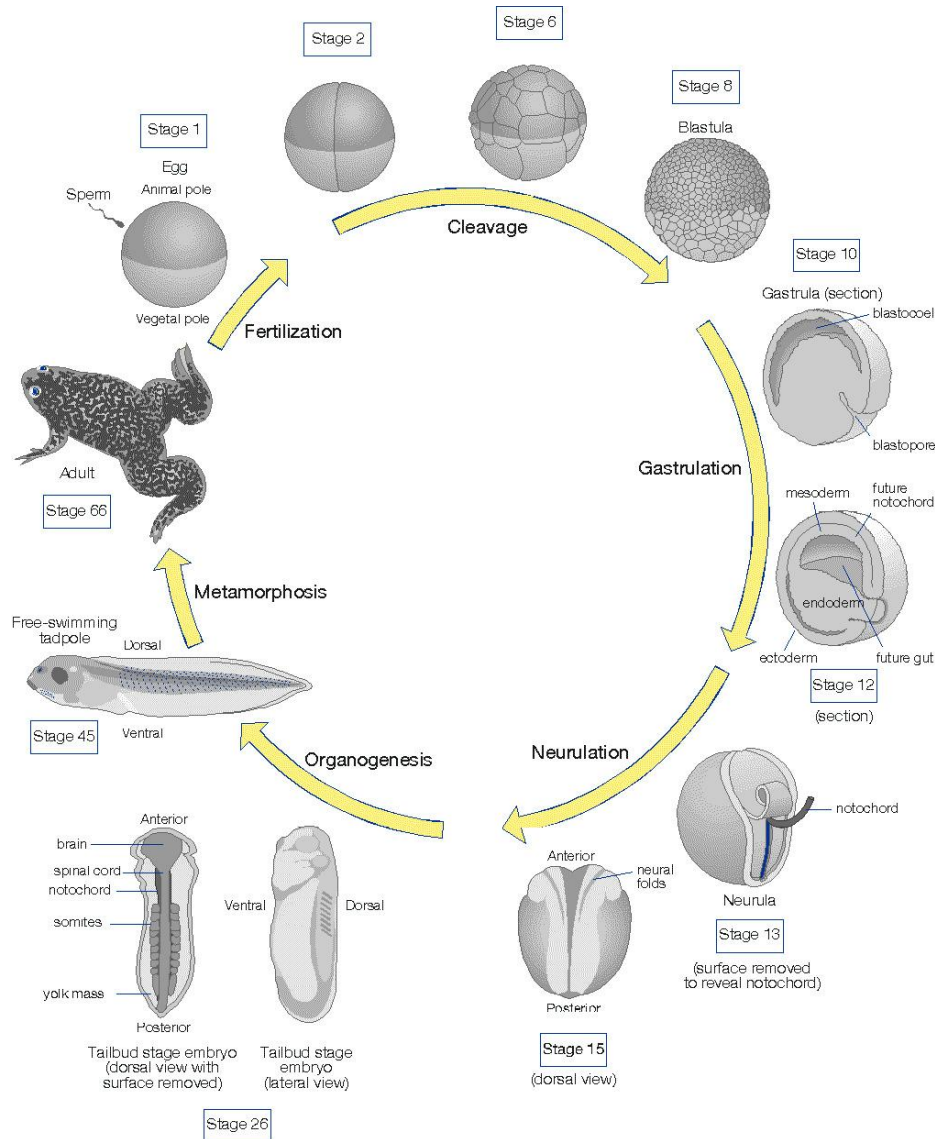


Figura 1.14. Ciclo de vida de la rana africana de garras *Xenopus laevis* (Extraído de Wolpert *et al.*, 1998). Después de la gastrulación y la neurulación ocurre la organogénesis, durante la cual, se produce la diferenciación de células o tejidos y la interacción entre ellos, en un proceso conocido como inducción secundaria. La parte anterior del tubo neural da lugar al cerebro y la parte que se encuentra sobre la notocorda dará lugar a la médula espinal. Alrededor del estadio 26, el embrión ha adquirido ya forma larvaria, la parte más anterior del cerebro se ha dividido en regiones y se pueden reconocer algunas estructuras complejas como el ojo y el oído. Desde las células de la cresta neural, se forman además tres arcos branquiales, el más anterior de los cuales dará lugar a la mandíbula inferior. En un estadio más posterior, las somitas y la notocorda se desarrollan completamente y en el estadio 40 aparece la boca. Finalmente, por la continuación de la notocorda, somitas y el tubo neural se forma la cola del renacuajo. Al final de la organogénesis, las neuronas han hecho conexiones entre ellas y con los músculos y la larva está entonces preparada para salir de la cubierta gelatinosa donde se encuentra para comenzar a beber y comer por sí misma. El renacuajo sufrirá la metamorfosis a partir del estadio 45 para dar lugar al individuo adulto, en el cual la cola sufre una regresión y se forman las patas.

1.4.2.1. Desarrollo del sistema nervioso en *Xenopus laevis*

La parte del ectodermo que descansa sobre la línea media dorsal se especifica en el neuroectodermo o placa neural durante la gastrulación, la cual, en el proceso posterior de neurulación y, tras la invaginación de los pliegues neurales, formará el tubo neural. En posteriores estadios el tubo neural se diferencia estableciendo el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal) y los nervios que inervan los músculos esqueléticos. El organizador de Spemman, ubicado en el labio dorsal del blastoporo durante la gastrulación temprana (**Figura 1.14**), controla este proceso en *Xenopus*. Durante este proceso, las células se mueven hacia dentro y la composición del labio dorsal va cambiando, de manera que las células del organizador en etapas tardías tienen propiedades de inducción diferentes a las tempranas y, por ejemplo, sólo pueden dar lugar a las estructuras posteriores de la cola. Uno de los marcadores tempranos más característicos que se expresan en el organizador, y que, mediante su acción, puede mimificar las propiedades del mismo, es la proteína *Goosecoid*. Así, la inyección de su mRNA es capaz de formar un eje secundario (Cho et al., 1991). La formación adicional de la cabeza en *Xenopus*, sin embargo, requiere la inhibición de las señales BMP, WNT y Nodal producidas en la gástrula. El organizador es capaz, además, de secretar los antagonistas necesarios para la formación de la cabeza y desarrollar el tejido neural. Chordin, Noggin y Follinstain inhiben las señales de BMP, Dickkopf inhibe las de WNT y Cerberus puede antagonizar tanto a BMP, WNT como Nodal (Piccolo et al., 1999; Niehrs, 1999; Yamaguchi, 2001; Niehrs et al., 2001). Se ha visto que la activación de la vía FGF es necesaria para la expresión de genes implicados en la inducción neural como es el caso del gen *churchill* (Sheng et al., 2003; Delaune et al., 2005). En el primer paso de la generación del tejido neural en vertebrados son necesarias, pues, la combinación de estas dos vías de señalización mesodérmica: Por un lado, la inhibición de BMP, WNT y Nodal, y por otro, la activación de FGF (Kudoh et al., 2004).

La cresta neural está conformada por un conjunto de células (NCC) que darán lugar a una serie de estructuras muy diversas del sistema nervioso periférico y del esqueleto craneofacial (**Figura 1.15**). Su inducción es un proceso de varios pasos que comienza en el estadio de gástrula temprana y continúa hasta el cierre del tubo neural.

Las señales WNT, FGF, y ácido retinoico también están implicadas y su activación induce la transcripción de factores como *sox9* y *sox10*, que, al mismo tiempo, activan el gen *snail*, uno de los marcadores tempranos de la cresta neural (Meulemans y Bronner-Fraser, 2005; Barembaum y Bronner-Fraser, 2005).

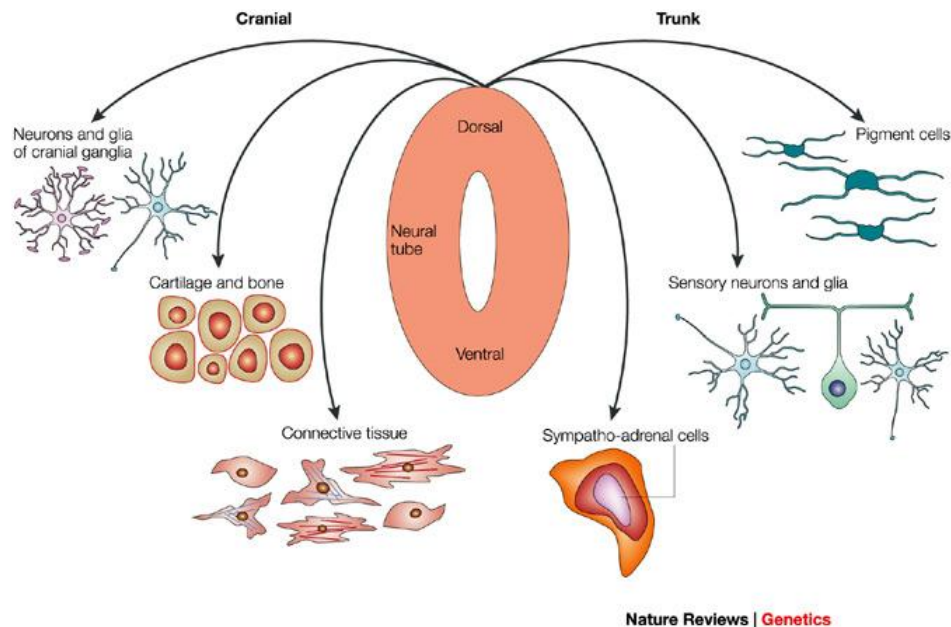


Figura 1.15 Derivados de las células de la cresta neural. Aunque las células de la cresta neural son pluripotentes, existen diferencias generadas por los distintos niveles antero-posteriores. Las NCC en el tronco forman melanocitos y diversas neuronas y glia, mientras en la parte craneal también pueden formar derivados mesenquimales. (Extraído de Knecht y Bronner-Fraser, 2002).

Durante el proceso de neurulación, las células de la cresta neural (NCC) van perdiendo las propiedades de adhesión celular entre ellas y adquiriendo sucesivamente receptores de superficie, así como metaloproteasas y otras proteínas de adhesión que les permiten responder a las interacciones célula-célula y a las señales ambientales que condicionaran su patrón de migración. Una vez que llegan a su destino, se agregan entre ellas para comenzar la diferenciación.

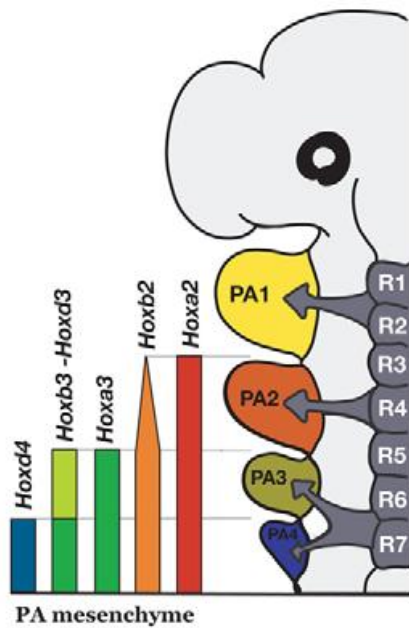
El siguiente paso, tras la inducción de la placa neural, requiere la formación de las distintas estructuras del futuro sistema nervioso central, esto es, su regionalización. El primer inductor aparece, en principio, en todo el mesodermo induciendo la formación de la parte anterior del tejido neural, mientras que una segunda señal aparece de manera gradual en el mesodermo, con la concentración más alta en la parte más posterior del

1.Introducción

embrión, y produce la transformación tardía. FGF, WNT y ácido retinoico han sido propuestos como factores responsables de esta segunda señal en los diferentes modelos de *Xenopus*, pollo y zebrafish (Foley et al., 2000; Kudoh et al., 2002; Aybar y Mayor, 2002; Sheng et al., 2003; Kudoh et al., 2004). Durante el proceso de regionalización, el cerebro en desarrollo se divide en tres áreas principales: proencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo. Este último, a su vez, tiene una organización segmentada en ocho rombómeros. Entre el mesencéfalo y el romboencéfalo existe una región, denominada istmos, que regula la organización del mesencéfalo. En la medula espinal, sin embargo, la estructuración de la raíz dorsal de los ganglios y los nervios motores ventrales se produce por somitas en intervalos regulares (un par por somitas). El mesodermo lateral, además, forma una serie de arcos branquiales poblados por NCC. Desde el tubo neural y, organizados de forma segmentaria, se producen las placodas craneales y las NCC, los cuales, conjuntamente, formarán los nervios craneales periféricos que inervarán la cara y el cuello. Al mismo tiempo, las NCC que migran hacia los tres primeros arcos branquiales darán lugar a la mayoría del esqueleto facial (Iulianella y Trainor, 2003).

Al final del proceso de neurulación e inmediatamente después del cierre del tubo neural, el futuro romboencéfalo se constriñe, mediante divisiones celulares y mecanismos poco conocidos, en las mismas posiciones que darán lugar a los rombómeros. Los límites entre rombómeros son barreras de restricción entre células de distinto linaje. Parece ser que las células de cada rombómero comparten propiedades adhesivas que les impiden mezclarse con aquellas de los rombómeros vecinos. Esta propiedad está mediada por las ephrinas y sus respectivos receptores (receptores Eph) (Cooke y Moens, 2002). De esta manera, los rombómeros se comportan de manera individual constituyendo unidades diferenciales de desarrollo. En vertebrados, y de forma conservada entre las distintas especies, los responsables de los procesos de regionalización en los rombómeros son los genes de la familia Hox (Krumlauf et al., 1993; Wilkinson, 1993; Tümpel et al., 2009). Estos genes presentan dominios de expresión marcados a lo largo del eje antero-posterior y confieren información posicional al embrión. En general, los rombómeros y la cresta neural de la que proceden expresan el mismo set de genes Hox, formando así el denominado “código Hox” (Wellik, 2009) (**Figura 1.16**). Tal es así para las NCC craneales que colonizan el 2º, 3º y 4º arco branquial pero no para el primero. A partir de estudios realizados en el

embrión de pollo, se distinguen, por tanto, dos dominios en las NCC que originan el esqueleto facial y visceral: un dominio rostral Hox-negativo, que se origina a partir de



las células que migran desde el mensencéfalo posterior y los rombómeros 1, 2 y parte del 3 hasta el 1º arco branquial, y que no expresan genes Hox, y un dominio caudal de expresión Hox-positiva (Creuzet et al., 2005). Si se retira el dominio de NCC Hox-negativas en los embriones, las estructuras faciales no llegan a formarse (Creuzet et al., 2002). Sin embargo, cualquier fragmento de las NCC Hox-negativas pueden regenerar una cara normal (Couly et al., 2002).

Figura 1.16. Código Hox en los arcos branquiales. Las barras de colores representan los patrones de expresión de genes Hox en las distintas subpoblaciones de NCC en cada rombómero que dan lugar al mesénquima de los arcos branquiales o faríngeos (PA). En el lado izquierdo, cada arco branquial expresa un determinado patrón de genes Hox, con la excepción del 1º (PA1) que no expresa ninguno. (Extraído de Minoux et al., 2009).

En todos los vertebrados, las NCC craneales migran sucesivamente desde los rombómeros de la región dorsal del romboencéfalo, con patrones característicos denominados mandibular, hioides y branquial, en el 1º, 2º y 3º y 4º arco branquial, respectivamente, mediante una organización segmentada, diferenciándose así en estructuras como los ganglios parasimpáticos y sensoriales, la cornea y el corioide del ojo, pero también en los cartílagos y los huesos del esqueleto y la cabeza (Sadaghiani y Thiébaud, 1987; Knecht y Bronner-Fraser, 2002; Le Douarin et al., 2007). Las NCC adquieren su valor posicional antes de que empiecen a migrar, lo cual está caracterizado por la expresión de los genes de la familia Hox. Sin embargo, aunque las poblaciones de NCC se especifican temprano en el desarrollo, son todavía pluripotentes cuando llegan a los lugares predestinados. Las posteriores señales que las diferenciarán ocurren más tarde y dependen de su posición. Tanto es así, que existe una correlación directa entre el tiempo de migración de las NCC desde el tubo neural y su potencial de desarrollo. De hecho, en la cabeza de *Xenopus laevis*, las células que migran más tempranamente pueblan los arcos faríngeos o branquiales y generan los derivados

ectomesenquimales: cartílago y tejido conectivo de la cara, mientras que las células que migran de manera más tardía, permanecen más cercanas al sistema nervioso central en desarrollo y dan lugar a las neuronas y la glia de los ganglios craneales (Hensey y Gautier, 1998).

1.4.2.2. Desarrollo craneofacial. Inducción de las placodas craneales

Además de las células de la cresta neural, el desarrollo del esqueleto de la cabeza y de los ganglios sensoriales requiere de una segunda estructura embrionaria: Las placodas craneales. Ambas estructuras se originan de los límites de la placa neural, entre el ectodermo no-neural y la placa neural y, debido a que comparten una serie de características comunes, se piensa que tienen un origen evolutivo común (Schlosser, 2008). Sin embargo, la cresta neural se diferencia de las placodas craneales en que las primeras darán lugar a un mayor número de tipos celulares y migrarán a distancias mucho mayores en el embrión, mientras que las placodas craneales, por el contrario, están restringidas a la región de la cabeza y provienen de toda la longitud del tubo neural. Además, mientras las neuronas de los ganglios periféricos en el tronco se originan exclusivamente de la cresta neural, las de los ganglios craneales tienen un origen mixto entre la cresta neural y las placodas (Baker y Bronner-Fraser, 2001) (Gerhart, 1989).

Las placodas craneales son engrosamientos transitorios del ectodermo en la cabeza del embrión que darán lugar a los órganos sensoriales (ojo, nariz y oreja) y a los ganglios sensoriales craneales. Se pueden distinguir las siguientes placodas: adenohipofisal, olfatoria, de lente, trigeminal, profunda, ótica, epibranchial, hipobranchial y de línea lateral. El desarrollo de estas placodas, en la mayoría de los vertebrados, se cree que comienza con la formación de una preplacoda (Bate y Jacobson, 1978; Nieuwkoop et al., 1985; Torres y Giráldez, 1998; Baker y Bronner-Fraser, 2001; Schlosser, 2010). Sin embargo, cada una presenta unas características propias. La especificidad de cada placoda dentro de la preplacoda de origen tiene lugar en un proceso de varios pasos, de acuerdo a su posición en el eje antero-posterior, depende de la influencia de los tejidos vecinos, a medida que se van formando durante el desarrollo, y, de la misma manera, éstas influirán también en el desarrollo de los tejidos adyacentes (**Figura 1.17**) (Schlosser, 2006).

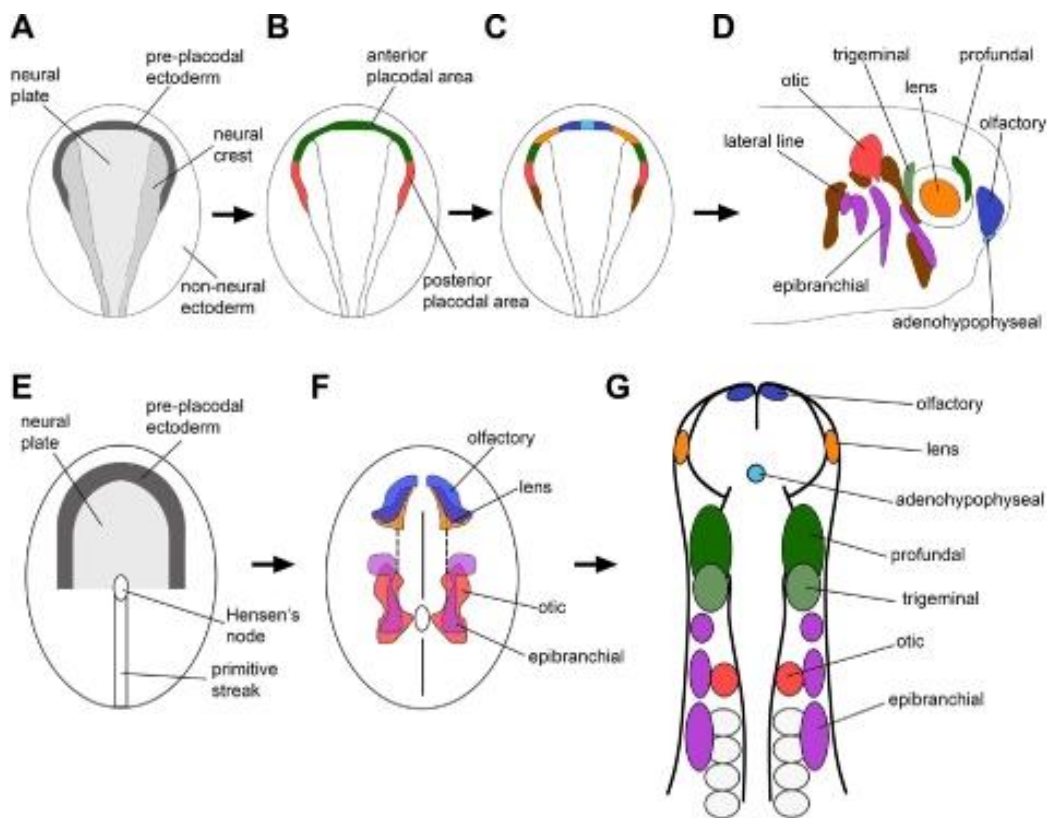


Figura 1.17. Mapas de destino de las placodas craneales en la placa neural anterior
 (A) Representación esquemática de los embriones de *Xenopus laevis* en el estadio de neurula. El ectodermo preplacodal se encuentra sobre la parte anterior de la placa neural y lateralmente con respecto a la cresta neural. (B) El ectodermo preplacodal se puede subdividir en dos dominios distintos: las áreas placodales anteriores y las posteriores que darán lugar a las subsecuentes placodas. (C) Los perfiles de expresión de los genes predicen la aparición de la placodas craneales: Adenohipofisal (azul claro), olfatoria (azul oscuro), de lente (naranja), profunda y trigeminal (verde), ótica (rosa), epibranchial (violeta) y de línea lateral (marrón). (A-C) Vistas dorsales con la parte anterior arriba. (D) Posición de las placodas craneales en el embrión en el estadio de yema de cola. Visión lateral con la parte anterior a la derecha y la dorsal arriba. (E) Representación esquemática del embrión de pollo en el estadio de neurula temprana mostrando la posición del ectodermo preplacodal (F) Mapa de destino del embrión de pollo en el estadio de 0-1 somitas mostrando que los precursores de las diferentes placodas, olfatoria/ de lente, y ótica/ epibranchial, están entremezclados y alrededor de la placa neural. (G) Placodas y sus derivados en las distintas posiciones a lo largo del neuroeje en el estadio de 10-13 somitas. (E-G) Vistas dorsales, de la anterior hacia arriba (Extraído de Park y Saint-Jeannet, 2010).

Aunque todas las placodas, excepto la de lente y la adenohipofisal, dan lugar a neuronas, además de otros tipos celulares, las placodas denominadas neurogénicas, que conformarán las neuronas sensoriales de los nervios craneales, son la trigeminal, ótica, de línea lateral y epibranchial, denominadas también dorsales y que, aparentemente, se

1.Introducción

forman en un estadio más tardío (Shimeld y Holland, 2000). Las placodas neurogénicas se subdividen, a su vez, en dos grupos: Las placodas dorsolaterales (trigeminal, ótica, y de línea lateral) que ocupan posiciones dorsales adyacentes al romboencéfalo y las placodas epibranchiales (geniculada, petrosa, y nodosa) que se encuentran más ventrales y están asociadas con el aspecto dorsoventral de los arcos branquiales.

Las placoda trigeminal/profunda constituirá las neuronas sensoriales de los lóbulos oftálmico y maxilomandibular en el ganglio trigeminal del nervio V (Baker y Bronner-Fraser, 2001). Se encuentra situada entre el futuro ojo y el oído, junto a la unión límite entre el mesencéfalo y el romboencéfalo y en su inducción están implicados factores secretados por el tubo neural dorsal (Stark et al., 1997).

El oído, a excepción de las células pigmentadas de la stria vascularis y del epitelio secretor de la cóclea (que se originan a partir de la cresta neural), se deriva casi enteramente de la placa ótica (Torres y Giráldez, 1998). En anfibios, esta placoda se concentra en una región cercana al rombómero 4 a excepción de otros organismos en los que se encuentra adyacente al rombómero 5 (Ohyama et al., 2007) y su inducción depende de los tejidos colindantes, del futuro romboencéfalo y del mesodermo de la cabeza (Park y Saint-Jeannet, 2008). Una vez que ha sido especificada, la placa ótica se invagina formando una copa que se separa de la superficie ectodérmica y forma la vesícula ótica u otocisto. A medida que tiene lugar dicha invaginación, los neuroblastos se separan de la parte anterior ventral del epitelio para dar lugar a las neuronas del ganglio vestibulococleares (estatoacústicas) del nervio VIII. Las divisiones celulares y los movimientos morfogénicos darán forma a las vesículas óticas en una estructura especializada, asimétrica y organizada.

Las neuronas derivadas de las placodas epibranchiales inervan los órganos internos para transmitir información como el pulso, la presión cardíaca y la distensión visceral desde la periferia al sistema nervioso central (Baker y Bronner-Fraser, 2001). Desde la parte rostral hasta la caudal comprenden las placodas geniculada, petrosal y nodosa, cada una asociada secuencialmente al primer, segundo y tercer surco branquial. Cada placoda contribuye exclusivamente a las neuronas viscerosensoriales de los ganglios distales de los nervios craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vagal) respectivamente, inervando así varios órganos viscerales y la papila gustativa

(Northcutt, 2004). Los ganglios proximales de los nervios craneales VII, IX y X se derivan de la cresta neural y producen las neuronas somatosensoriales (D'Amico-Martel y Noden, 1983). La diferenciación ocurre por el desprendimiento de células de la placoda engrosada. Los neuroblastos desprendidos se fusionan para formar el ganglio que hará las conexiones apropiadas hacia sus dianas. Experimentos recientes en zebrafish indican que la inducción depende de las señales mesodérmicas que establecen tanto las placodas epibranchiales como el desarrollo del endodermo faríngeo, requerido subsecuentemente, éste último, para promover la neurogénesis en las placodas (Nechiporuk et al., 2007). Otros experimentos señalan que las placodas ótica y epibranchial comparten las mismas señales derivadas del romboencéfalo (Sun et al., 2007) y es posible que estas dos placodas se originen de un mismo precursor común definido por la expresión de *pax2* (Sun et al., 2007; Ladher et al., 2010). Esta característica también la comparte la placoda de la línea lateral, lo que indica que estas tres placodas están relacionadas evolutivamente y en su desarrollo, y se cree que todas ellas provienen de un mismo dominio común: El área placodal posterior (Baker et al., 2008; Ladher et al., 2010).

La inducción y diversificación de las placodas es un tema complejo que requiere la acción de una gran cantidad de genes reguladores. Son numerosas las revisiones que han aportado datos en base a los niveles celulares y moleculares de estos procesos (Baker y Bronner-Fraser, 2001; Schlosser y Ahrens, 2004; Schlosser, 2006, 2008; Ladher et al., 2010). Los genes reguladores del desarrollo de las placodas forman parte de las familias de genes Six, Eya y Pax, que se expresan en todas las placodas sensoriales de vertebrados, de manera altamente conservada (Streit, 2004; Bhattacharyya y Bronner-Fraser, 2004; Schlosser y Ahrens, 2004; Schlosser, 2006; Bailey y Streit, 2006; McCabe y Bronner-Fraser, 2009).

Los genes Six codifican factores de transcripción capaces de unirse directamente al DNA, mientras los genes Eya codifican proteínas con actividad tirosina fosfatasa que intervienen en la transcripción, indirectamente por interacción con otras proteínas, entre las cuales se encuentran los factores de transcripción Six. En el caso de la familia de genes Six existen seis variantes (*six1-6*) y cuatro en la familia de Eya (*eya1-4*) (Kawakami et al., 2000; Rebay et al., 2005). Tanto los genes Six como Eya se expresan inicialmente en la preplacoda pero también más tarde, de forma homogénea, en la

1.Introducción

mayoría de las placodas y sus estructuras derivadas, controlando procesos similares en cada una de ellas. En *Xenopus*, la sobreexpresión de *six1* conlleva a una expansión de la región preplacodal a partir de la placa neural, la cresta neural y la epidermis. Mientras que el silenciamiento del gen con el morfolino *six1* produce la pérdida de los marcadores preplacodales, incluido *eyal* (Brugmann et al., 2004; Brugmann y Moody, 2005). Es por ello que se ha atribuido a *six1* y *eyal* un papel esencial en el desarrollo de las placodas. A pesar de que todavía no se sabe con exactitud cuál es su función en la región preplacodal, se especula que podrían conferir al ectodermo la capacidad placodal o al límite de la placa neural anterior la señal necesaria para la aparición placodal (Streit, 2004; Bailey y Streit, 2006). Estos genes, además, se encuentran altamente conservados durante la evolución en los órganos sensoriales de *Drosophila* y en vertebrados (Schlosser, 2007).

Los genes Pax son una familia de factores de transcripción que regulan un amplio rango de procesos de desarrollo tales como: proliferación, diferenciación, adhesión celular y señalización. Para su clasificación, se dividen en cuatro grupos basados en sus secuencias: Grupo *pax1/pax9*, grupo *pax2/pax5/pax8*, grupo *pax3/pax7* y grupo *pax4/pax6* (Dahl et al., 1997; Chi y Epstein, 2002). Generalmente, todas las placodas expresan uno o más genes Pax en estadios relativamente tempranos del desarrollo. La expresión de cada uno de ellos puede determinar o caracterizar las distintas placodas (**Figura 1.18**). De esta manera, *pax6* se expresa en el sistema nervioso central y en el ectodermo que dará lugar a las placas más anteriores: adenohipofisal, olfatoria, y de lente (Gehring y Ikeo, 1999; Bhattacharyya y Bronner-Fraser, 2004); *pax3* se detecta en la placoda trigeminal durante el establecimiento de su identidad neuronal y durante la neurulación en la parte dorsal de la placa neural (Baker y Bronner-Fraser, 2000); *pax8* es un marcador temprano de la placoda ótica y *pax2* se expresa tanto en la placoda ótica como en las epibranchiales. Durante la embriogénesis, en el estadio de la placa neural, *pax2* y *pax8* se expresan además en la placoda posterior para mantenerse en el desarrollo de las placodas óticas y epibranchiales. En zebrafish, *pax2* y *pax8* funcionan sinérgicamente en la especificación de la placoda ótica (Hans et al., 2004). Mientras que en pollo, *pax2* parece controlar la identidad neuronal (Baker y Bronner-Fraser, 2000). Los genes Pax, además, parecen estar implicados en la morfogénesis, el *patterning* y la diferenciación placodal. (Baker y Bronner-Fraser, 2001; Streit, 2002, 2004; Schlosser y Ahrens, 2004; Schlosser, 2006).

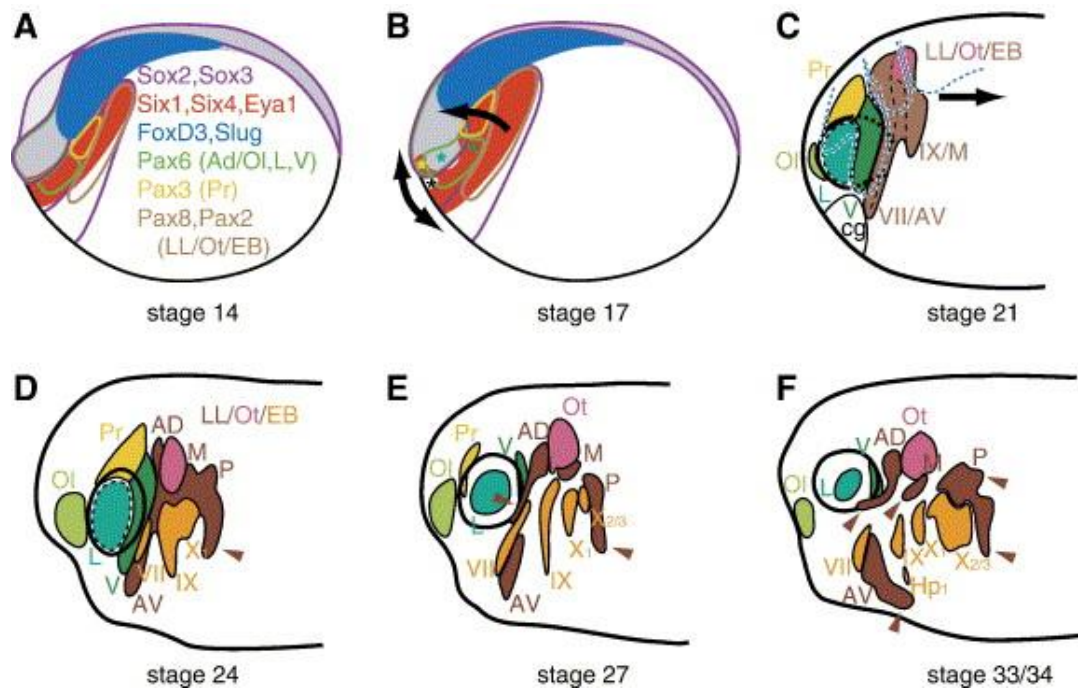


Figura.1.18. Desarrollo de la placodas en visión lateral de *Xenopus laevis*. La expresión de cada gen se correlaciona con la diferentes placodas mediante colores. (A, B) Expresión genética durante los estadios de neurulación. La preplacoda (rojo) se encuentra, en la parte anterior, junto a la placa neural (gris) y lateralmente a la cresta neural (azul). (C–F) Desarrollo de las placodas después del cierre del tubo neural hasta el estadio de cola de yema (Schlosser, 2006).

Tras la formación de la preplacoda, el desarrollo de las subsecuentes placodas, y la asignación de su identidad surge en respuesta a señales inductivas adicionales y secuenciales entre la región preplacodal y los tejidos adyacentes (Bhattacharyya y Bronner-Fraser, 2004; Schlosser y Ahrens, 2004; Brugmann y Moody, 2005; Schlosser, 2006; McCabe y Bronner-Fraser, 2009). Trabajos recientes sugieren que todos los precursores placodales se inician con el mismo tipo de señal bioquímica, aquella que inicia la formación de la placoda de lente, representando el estado basal de todas las placodas sensoriales, y siendo necesaria la represión de esta señal para la formación del resto de las placodas (Bailey et al., 2006). Las moléculas implicadas son miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). La represión de la señalización del factor *fgf8* reprime el carácter de la lente y es suficiente para dar lugar al desarrollo de la placa olfatoria. Se ha sugerido, además, que la combinación de las distintas señales de otros factores de la misma familia podrían estar implicados en la formación del resto de las placodas (Bailey et al., 2006). Sin embargo, cada vez hay más

1.Introducción

evidencias de que la formación de las futuras placodas requiere de la acción conjunta, combinada o alternada, de varias señales, entre ellas: BMP, WNT y FGF (Litsiou et al., 2005; Canning et al., 2008a).

La señal de BMP induce la formación de la epidermis a partir del ectodermo y su represión es necesaria para la constitución de la cresta neural y las células placodales (Stern, 2005). Los antagonistas de la señal de BMP derivados del mesodermo, tales como Chordin, Noggin y Follistatina, crean un gradiente decreciente de la señal de BMP hacia el límite de la cresta neural (Marchant et al., 1998; Tribulo et al., 2003). En *Xenopus*, este gradiente es en parte responsable del posicionamiento del ectodermo preplacodal (Brugmann et al., 2004). Durante el estadio de gástrula en pollo, *bmp2* y *bmp4* se expresan en la región preplacodal y estas señales están implicadas en la especificación de las placodas olfatoria y de lente (Sjödahl et al., 2007). En ratón, sin embargo, la acción de *bmp4* es necesaria para la diferenciación de las células de las placodas de lente junto con *bmp7* pero no para la de las olfatorias (Furuta y Hogan, 1998; Wawersik et al., 1999).

La implicación de los FGF como factores clave en la iniciación de la formación de la región límite de la placa neural es ya un hecho consolidado en el estudio del desarrollo placodal. Una expresión aberrante de *fgf8* en pollo induce la expresión ectópica de los genes específicos de la placa neural (Streit y Stern, 1999; Litsiou et al., 2005). Sin embargo, tanto en pez como en rana se ha visto que la señalización de FGF no es suficiente para generar la cresta neural y el inicio de las placodas, y existen evidencias de que puede ser necesaria una acción en concierto con BMP (Ahrens y Schlosser, 2005; Litsiou et al., 2005; Hong et al., 2008). Así, *fgf8* regula positivamente a *six1* cuando BMP está inhibido en el ectodermo de *Xenopus* (Ahrens y Schlosser, 2005). *fgf8* se expresa en el mesodermo paraxial y en la cresta neural anterior de rana (Christen y Slack, 1997). La pérdida de función con el morfolino de *fgf8a* provoca una regulación negativa importante de los genes de las preplacoda y la cresta neural (Hong y Saint-Jeannet, 2007). Durante la especificación de las placodas, se cree que son varios los miembros de la familia FGF los implicados. Así por ejemplo, en pollo, *fgf19* expresado en el mesodermo paraxial y *fgf8* derivado del endodermo están involucrados en la inducción de la placa óptica, mientras en ratón son *fgf8* y *fgf10* derivados del mesodermo paraxial (Ladher et al., 2005). En zebrafish, por el contrario, es necesaria la

combinación de *fgf3* y *fgf8* (Phillips et al., 2001). Por otro lado, *fgf3* y *fgf8* también parecen tener un papel relevante en la especificación de las placodas epibranchiales en zebrafish (Nechiporuk et al., 2007; Sun et al., 2007).

La señal canónica de WNT es necesaria conjuntamente con la atenuación de BMP para la especificación de la cresta neural (Knecht y Bronner-Fraser, 2002; Huang y Saint-Jeannet, 2004). Sin embargo, la inhibición de esta señal favorece la formación del tejido placodal a partir de la cresta neural (Brugmann et al., 2004; Litsiou et al., 2005). En la inducción de la placoda ótica, se ha observado una regulación positiva del gen *pax2* en el ectodermo ótico cuando se cultiva en presencia de *fgf19* y *wnt8c* frente a explantes de pollo cultivados con *fgf19* (Ladher et al., 2000). En *Xenopus*, la señalización de WNT parece cooperar con las señales de *fgf3* y *fgf8* para la especificación de la placoda ótica (Park y Saint-Jeannet, 2008). La señal WNT también se ha visto implicada en la formación de la placoda trigeminal en el embrión de pollo. Su activación previene a las células a mantener la inducción oftálmica trigeminal mediante la expresión de *pax3* y *eya4*. Sin embargo, la activación de WNT no es suficiente para aumentar la expresión de *pax3*, lo que indica que han de existir, necesariamente, otras señales para producir la inducción de la placoda trigeminal (Lassiter et al., 2009).

Además de BMP, WNT y FGF, existen otras moléculas implicadas en los procesos del desarrollo placodal. Así por ejemplo, el ácido retinoico (RA) tiene un papel importante en la diferenciación y el *patterning*. En zebrafish, la aplicación de RA aumenta la inducción ótica en un proceso dependiente de la señal de FGF (Hans y Westerfield, 2007). El RA es capaz, además, de regular genes del romboencéfalo, entre ellos, los genes Hox que dan identidad a los rombómeros (Romand et al., 2006). Las quimiocinas y sus receptores son requeridos para aportar la direccionalidad durante la migración del primordio de la línea lateral en zebrafish. La cooperación entre las señales de quimiocinas, WNT y FGF regulan los mecanismos por los que el primordio mantiene la integridad durante la migración (Dambly-Chaudière et al., 2007; Aman y Piotrowski, 2008; Nechiporuk y Raible, 2008). La señalización de CXCL12/ CXCR4 es necesaria para el desarrollo de la placoda olfatoria (Miyasaka et al., 2007). La señalización de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) es necesaria en la formación del lóbulo oftálmico de la placoda trigeminal en el pollo (McCabe y Bronner-Fraser,

2009). En la inducción de la placoda adenohipofisaria, el factor homólogo de la familia hedgehog *Shh* es uno de los factores primarios implicados. Su incremento de expresión causa un aumento en el número de células pituitarias a cargo de los precursores de la lente, mientras que embriones de zebrafish doble mutantes para *shh* y *twhh* han perdido casi completamente la pituitaria anterior (revisado en Pogoda y Hammerschmidt, 2009).

1.5.Otros receptores acoplados a proteína G

1.5.1. Receptores de adenosina A_{2A}

La adenosina es un nucleósido formado por una base purínica, la adenina, y una ribosa. Tanto la adenosina como sus derivados resultan esenciales en el metabolismo celular, actuando como intermediarios de rutas metabólicas en forma de ATP o AMPc (Pull y McIlwain, 1972) o formando parte de cofactores necesarios para diversas reacciones enzimáticas de oxidación-reducción (deshidrogenasas dependientes de NAD⁺, NADP⁺, FAD) o de metilación, (S-adenosilmetionina o SAM) (Arch y Newsholme, 1978). Además, forman parte de las macromoléculas encargadas del almacenamiento y la transmisión de la información genética: los ácidos nucleicos. La adenosina se encuentra tanto en el compartimiento intracelular como en el extracelular en una concentración tal que resulta de la acción de los enzimas que controlan su síntesis y degradación, así como de los transportadores nucleosídicos de membrana (Thorn y Jarvis, 1996). La producción intracelular de adenosina ocurre a través dos vías de síntesis: la desfosforilación de AMP por la 5'-nucleotidasa (5'-NT) y la hidrólisis de S-adenosilhomocisteína (SAH) por la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH). Las vías de degradación a nivel intracelular también son dos: la fosforilación de la adenosina a AMP por la adenosina quinasa (AK) y la desaminación a inosina por la adenosina desaminasa (ADA) (Fisher y Newsholme, 1984). Extracelularmente, la producción de adenosina ocurre por la acción de diversas ectonucleotidasas que degradan el ATP, ADP, AMP y polifosfatos de diadenosina (A₂pN) que provienen del interior celular, mientras su degradación se produce por desaminación a inosina mediante la acción del enzima ecto-adenosina desaminasa (ecto-ADA) (Franco et al., 1998).

Los nucleótidos y nucleósidos purínicos, ATP, ADP, polifosfatos de diadenosina (ApnA) y adenosina actúan como neuromoduladores a través de sus receptores específicos: Los receptores purinérgicos. Estos receptores se dividen en receptores de adenosina (P1) y receptores de nucleótidos (P2) (Fredholm et al., 1994). A su vez, los receptores de adenosina se clasifican en 4 subtipos en base a sus propiedades moleculares, bioquímicas y farmacológicas: los receptores A₁, A_{2A} (A_{2AR}), A_{2B} y A₃, todos ellos pertenecientes a la familia de los GPCR. Los receptores A₁ y A_{2A} muestran alta afinidad por adenosina y se expresan mayoritariamente en el CNS. Por el contrario, los A_{2B} y A₃ muestran baja afinidad por adenosina y su activación es tanto más relevante cuanto mayor es el incremento en los niveles de adenosina.

El gen para los A_{2AR} humanos se encuentra en el cromosoma 22q11.2 y contiene 2 exones separados por un único intrón de casi 7kbp (Peterfreund et al., 1996; Ledent et al., 1997). Hasta la fecha, se han identificado dos inicios de transcripción con dos promotores de expresión dependiente del tipo celular (Stehle et al., 1992). La proteína codificada, de 45 kDa, presenta un lugar potencial de glicosilación, en la que se pueden unir dos tipos de glúcidos diferentes, dividiendo a los receptores A_{2AR} en dos poblaciones, glicosilados y no glicosilados, con igual capacidad de unión al ligando (Barrington et al., 1990). A diferencia de los otros receptores de adenosina, los A_{2AR} presenta una cola muy larga que parece estar implicada en la formación del heterómero con los receptores de dopamina D₂ y en la interacción de A_{2AR} con el citoesqueleto de actina (Canals et al., 2003; Burgueño et al., 2003). Una exposición prolongada del agonista puede inducir la desensibilización rápida de los A_{2AR}, mediante la internalización del mismo a través de la fosforilación mediada por GRK (Newman y Levitzki, 1983; Mundell et al., 1998; Palmer y Stiles, 1997; Mundell y Kelly, 1998).

La principal vía de transducción de señal de los A_{2AR} depende de la activación de la AC por acoplamiento a G_{s/olf} (Kull et al., 1999, 2000). La activación de la AC incrementa los niveles de AMPc que activa a la PKA, la cual, a su vez, regula el estado de fosforilación de varias proteínas. En este sentido, la activación de los A_{2AR} puede conducir a la activación de CREB inhibiendo la actividad de la proteína fosfatasa 1 (PP-1) (Kull et al., 2000; Higuchi et al., 2000) a través de la fosforilación de DARPP-32 por

1.Introducción

la PKA (Kull et al., 1999, 2000). La PKA estimula, además, la proteína fosfatasa-2A (PP-2A), principal responsable de la desfosforilación de DARPP-32 (Higuchi et al., 2000), impidiendo así su propia inhibición a través de la forma fosforilada de DARPP-32 que es capaz de inhibir a la PKA (Higuchi et al., 2000; Lindskog, 2008). Los A_{2A}R, a través de la activación de la PKA y la fosforilación de CREB en neuronas GABAérgicas estriatopalidales, pueden producir un aumento de la transcripción de genes como c-fos, preproencefalina y neurotensina (Mayr y Montminy, 2001; Borsook y Hyman, 1995) (Mayr and Montminy, 2001). La activación de CREB por los A_{2A}R también puede estar mediada través de la activación de la vía de las MAPK (Sexl et al., 1997; Schulte y Fredholm, 2003) de forma dependiente o no de la acumulación de AMPc y la activación de PKA. La acumulación de AMPc y la activación de MAPK parecen producir distintas y contradictorias respuestas celulares como proliferación o impedimento del crecimiento o apoptosis y diferenciación, en función de la duración y extensión del estímulo y del tipo celular. Además de la principal vía mediada por G_{s(olf)}/AC, los A_{2A}R pueden inducir segundos mensajeros pertenecientes a otras vías de señalización, tales como la PLC (Wirkner et al., 2000) y PI3K/Akt (Lee and Chao, 2001).

Mediante autorradiografía con el agonista [³H]CGS 21680 se detectó un marcaje intenso en el estriado, tanto en el caudato-putamen (estriado dorsal) como en el núcleo accumbens (estriado ventral), además de en el tubérculo olfatorio y en la parte externa del globo pálido de cerebro de rata y humano (Jarvis y Williams, 1989; Parkinson y Fredholm, 1990; Martinez-Mir et al., 1991; Svenningsson et al., 1997). Esta distribución fue corroborada por estudios de Northern blot (Fink et al., 1992; Peterfreund et al., 1996) e hibridación *in situ* (Fink et al., 1992; Augood y Emson, 1994; Svenningsson et al., 1997). Los A_{2A}R son muy abundantes en las proyecciones de las neuronas estriatopalidales que expresan encefalina (marcador para este tipo de neuronas), que también expresan el receptor D₂ de dopamina. Mediante técnicas más sensibles como las inmunohistoquímicas, se han encontrado distintos niveles de expresión en corteza, amígdala, hipocampo, hipotálamo, tálamo y cerebelo (Rosin et al., 1998). En tejidos periféricos, hay expresión de A_{2A}R en bazo, timo, corazón, pulmón, riñón, leucocitos y plaquetas (Moreau y Huber, 1999).

Estudios recientes han puesto de manifiesto la gran importancia de los A_{2A}R y su posible implicación en muchos desordenes neuronales (Moreau y Huber, 1999) (Moreau and Huber, 1999). El tratamiento con antagonistas de este receptor se considera de valor terapéutico para la enfermedad del Parkinson (Jenner, 2005), así como en fenómenos de psicosis y esquizofrenia.

Sobre la interacción funcional entre el sistema adenosínico y el endocannabinoide se ha hablado en el apartado anterior: heterómeros del receptor de cannabinoides CB₁.

1.5.2. Receptores de serotonina 5HT_{2C}

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT) es una monoamina que se sintetiza a partir del L-triptófano en dos pasos: Hidroxilación del L-triptófano en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) catalizada por la triptófano hidrolasa (Thp), y posteriormente, por descarboxilación del 5-HTP en 5-HT catalizada por la dercarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (Addc) y el coenzima fosfato de piridoxal. Su degradación requiere la desaminación oxidativa de la cadena amino lateral por una oxidasa monoamina (Mao), dando lugar a la 5-hidroxi-indol-acetaldehído, que se oxidará seguidamente al ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HAA) eliminado por la orina. Existen dos tipos distintos de triptófano hidrolasas: *Thp1*, la isoforma no neuronal presente fundamentalmente en la glándula pineal y *Thp2* o isoforma neuronal, expresada exclusivamente en las neuronas del núcleo del rafé y el plexo mientérico (Hasegawa y Ichiyama, 1987; Makita et al., 1990; Ehret et al., 1991; Walther y Bader, 2003).

En la glándula pineal la serotonina es un producto intermedio en la síntesis de melatonina, principal molécula responsable del ritmo circadiano. En la periferia, el 95% de la serotonina se sintetiza a partir de las células cromafines del tracto intestinal (Gershon, 1999) dónde participa en diferentes respuestas fisiológicas como: náusea, secreción intestinal y movimientos peristálticos, y está implicada en enfermedades gastrointestinales (Kim y Camilleri, 2000). La serotonina producida en el tracto

1.Introducción

intestinal se libera a la sangre y es almacenada en las plaquetas dónde participa en procesos de coagulación sanguínea, homeostasis y respuestas inmunes mediadas por células T (Vanhoutte, 1991). Las neuronas productoras de serotonina se localizan fundamentalmente en una región restringida del tronco encefálico, la mayoría en el núcleo del rafé, en la parte media del romboencéfalo, y una pequeña parte en la formación reticular. Las neuronas que contienen serotonina se organizan en dos grupos: la división caudal y la rostral, dependiendo de la inervación de sus axones, que llegan a todas las áreas cerebrales y a la médula espinal.

La serotonina actúa a través de dos tipos de receptores: ionotrópicos, que son canales iónicos con baja afinidad pero de rápida activación y metabotrópicos, que son GPCR de alta afinidad pero de activación lenta. Existen 15 genes clonados en mamíferos codificantes para los receptores de serotonina (5HTR) (Hoyer y Martin, 1997), de los cuales, sólo los receptores 5-HT₃ son receptores ionotrópicos mientras el resto pertenecen a la familia GPCR. Los metabotrópicos se clasifican en cuatro grupos en base a los principales segundos mensajeros a través de los cuales señalizan: Los receptores 5-HT₁, acoplados a proteínas G_{ai}/G_{ao}, los 5-HT₂ acoplados a G_{αq}, los 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ acoplados a la proteína G_s y los 5-HT₅ de acoplamiento desconocido (Raymond et al., 2001). Los receptores 5-HT₂ se subdividen, a su vez, en tres miembros de una misma familia, denominados: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, y 5-HT_{2C} (Hoyer et al., 1994). Señalizan a través de la vía de la PLC-β (Peroutka, 1995) pero pueden utilizar otros segundos mensajeros según el tipo de célula en la que se encuentren.

Los receptores 5-HT_{2C} (5-HT_{2C}R) tienen propiedades farmacológicas y moleculares características y propias, entre ellas, la actividad constitutiva (Berg et al., 2008). Como el resto de los miembros de su subfamilia, están asociados a rutas de señalización clásicas como la vía G_{αq11}, la subsecuente activación de la PLC-β, liberación de Ca²⁺ de los reservorios intracelulares y la activación de la PKC (Raymond et al., 2001; Cussac et al., 2002). Sin embargo, el 5-HT_{2C}R puede estar acoplado también a la fosfolipasa D (PLD) (McGrew et al., 2002) y a la fosfolipasa A2 (PLA2) (Berg et al., 1998). Además, es capaz de activar la ruta de las MAPK, estimulando las quinasas 1 y 2 (ERK 1/2) (Werry et al., 2005).

En cuanto a la distribución, los 5HT_{2C}R se encuentran ampliamente extendidos en el CNS y su papel principal es la regulación de la red de excitabilidad neuronal. En el cerebro de rata, se ha detectado expresión en plexo coroideo, corteza, núcleo accumbens, amígdala, hipocampo, núcleo caudado y sustancia nigra, mientras que en el cerebro humano los anticuerpos marcaron corteza, sustancia nigra y cerebelo (Abramowski et al., 1995; Abramowski y Staufenbiel, 1995). La activación por agonistas de este receptor y su actividad constitutiva es capaz de influir negativamente en las neuronas dopaminérgicas mesocorticales, mesolímbicas y nigroestriatales, disminuyendo la liberación de dopamina (Gobert et al., 2000). En este sentido, los antipsicóticos atípicos y los agonistas inversos de este receptor, capaces de disminuir la actividad constitutiva del receptor, pueden impedir esta inhibición, activando, así, el sistema dopaminérgico (Gobert et al., 2000; De Deurwaerdère et al., 2004; Berg et al., 2008). Los 5-HT_{2C}R constituyen, pues, una relevante diana terapéutica en el tratamiento de desórdenes neuropsiquiátricos como la depresión y los síntomas negativos de la esquizofrenia, pero también de enfermedades relacionadas con disfunciones en las neuronas dopaminérgicas como el Parkinson o la adicción (Berg et al., 2008). El ratón que no expresa 5-HT_{2C}R presenta epilepsia y un fenotipo obeso provocado por un aumento en la ingesta de alimentos, lo cual implica al receptor en la inhibición de la excitabilidad neuronal y en la regulación del peso corporal y la ingesta (Tecott et al., 1995).

Dada la implicación, tanto del sistema serotoninérgico como el endocannabinoide, en los estados emocionales, se ha propuesto una posible interacción funcional entre ellos. Un hecho clave en la determinación de esta interacción ha sido la observación de que el ratón *knock out* para el CB₁R muestra una reducción en las respuestas funcionales mediadas por los receptores de serotonina 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, tiene alterados diferentes componentes en la retroalimentación de 5-HT y muestra un fenotipo de tipo depresivo (Mato et al., 2007; Aso et al., 2009, 2011). Otras evidencias sugieren que los efectos antidepresivos ejercidos por los endocannabinoides podrían, de hecho, estar mediados por la serotonina. Así, la inhibición del enzima encargado de la degradación de la AEA (FAAH) produce un aumento en la excitación de las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe que es inhibida por el antagonista de CB₁R, rimonabant (Gobbi et al., 2005). El tratamiento subcrónico con el agonista cannabinoide no selectivo WIN55,212-2 a bajas dosis produce un sustancial efecto

1.Introducción

antidepresivo que es inhibido por rimonabant y, curiosamente, también por el inhibidor de la síntesis de serotonina: paraclorofenilalanina (Bambico et al., 2007). Se ha sugerido, además, que el mecanismo antidepresivo ejercido por los cannabinoides podría ser el resultado de la desinhibición de las proyecciones excitatorias del mPFC hasta las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rapé (Moreira, 2007).

2. OBJETIVOS

2.Objetivos

Los endocannabinoides juegan un papel fundamental como neuromoduladores y su acción se inicia a través de la interacción con los receptores de membrana CB₁R y CB₂R principalmente. A diferencia del CB₁R, que se expresa de forma profusa en el cerebro, el CB₂R ha sido descrito, preferencialmente, con una localización periférica. En el cerebro, se ha sugerido recientemente la expresión neuronal y no neuronal del CB₂R, pero su distribución específica y su función fisiológica resultan todavía harto desconocidas. Por ello, el Objetivo General de esta Tesis ha sido *determinar la expresión neuronal de los CB₂R en el CNS, investigar su relación con los CB₁R, así como su posible función durante el desarrollo del sistema nervioso en vertebrados*. Para la consecución de este Objetivo General se han llevado a cabo los objetivos parciales que se enumerarán a continuación.

Dado que la presencia y el papel funcional de los CB₂R en el CNS es todavía una materia ambigua y en controversia, a la vez que escasamente descrita, es necesario el desarrollo de nuevas herramientas y técnicas, más fiables que la inmunodetección clásica con anticuerpos, que permitan detectar la expresión del receptor y mapear su localización en el CNS, tanto a nivel tisular como celular. Para ello nos planteamos el siguiente objetivo:

Objetivo 1. *Diseñar unos “primers” y una sonda específica que permitan detectar la mRNA del CB₂R mediante PCR e hibridación in situ (ISH) para investigar la expresión de estos receptores en células neuronales de distintas áreas del cerebro de primates.*

La señalización retrógrada o no de los endocannabinoides, capaz de ejercer una gran versatilidad de acciones en el sistema nervioso central, ha sido descrita mediada fundamentalmente por el CB₁R, dada su amplia distribución encefálica. La predicción de la función fisiológica del CB₂R, sin embargo, no resulta tan obvia, ya que se expresa de forma minoritaria en el cerebro. Se hacía necesario encontrar un modelo que permitiera dilucidar, *in vivo*, algunos aspectos clave sobre el papel de los CB₂R en el sistema nervioso. En este contexto nos propusimos el siguiente objetivo:

Objetivo 2. *Estudiar el papel funcional de los CB₂R durante el desarrollo del sistema nervioso en vertebrados recurriendo al modelo de desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*.*

El hecho de que una misma célula requiera de receptores distintos para un mismo neurotransmisor o neuromodulador resulta, en cierta manera, redundante. Una posible explicación es que la interacción directa o indirecta entre los distintos receptores conlleve la adquisición de un nuevo grado de regulación intrínseca de los mismos. Dado que los CB₁R son ubicuos, es posible que codistribuyan con los CB₂R, convirtiéndose así en candidatos para la interacción molecular o heteromerización. Teniendo en cuenta estos hechos nos planteamos el siguiente objetivo:

Objetivo 3. *Determinar tanto la formación de homómeros de CB₂R como la formación de heterómeros entre el CB₂R y CB₁R y analizar las propiedades bioquímicas de estos heterómeros en cultivos celulares.*

La formación de heterómeros con los CB₁R puede aportarnos respuestas esclarecedoras, concernientes a la funcionalidad de los CB₂R en el cerebro, en tanto y en cuanto se demuestre su relevancia fisiológica. Para lo cual, había que desarrollar métodos directos e indirectos, distintos de los utilizados en los cultivos celulares, con tal de determinar la expresión de los heterómeros dentro del tejido cerebral. Considerando esta puntualización nos propusimos el siguiente objetivo:

Objetivo 4. *Investigar la expresión de heterómeros CB₁R-CB₂R en distintas áreas del cerebro de rata, dónde previamente ha sido descrita la presencia de ambos receptores de forma individual.*

Finalmente, los receptores de cannabinoides son receptores acoplados a proteína G (GPCR). Los receptores pertenecientes a esta familia tienen capacidad, no sólo de formar homómeros y heterómeros entre receptores para una misma hormona, sino de formar heterómeros con otros receptores GPCR (Ferré et al. 2009). Estos heterómeros actúan como entidades funcionales con características bioquímicas propias y diferentes a sus unidades monoméricas por separado. Esta capacidad ha sido ampliamente estudiada para el CB₁R pero no para los CB₂R, por lo que nos planteamos un último objetivo:

Objetivo 5. *Estudiar la capacidad de formación de heterómeros entre el CB₂R y otros GPCR, como son los receptores de adenosina A_{2A}, y de serotonina 5HT_{2C}.*

*No son razones, son mostraciones
perfectamente objetivas. Vos tendés a moverte
en el continuo, como dicen los físicos,
mientras yo soy sumamente sensible a la
discontinuidad vertiginosa de la existencia.*

Rayuela, J.Cortázar.

3. RESULTADOS

Enric I. Canela Campos y Rafael Franco Fernández
Grupo de Neurobiología Molecular
Avd. Diagonal, 643
Edificio Nuevo, Planta -2
08028 Barcelona

La tesis doctoral de Lucía Callén Herrero “Expresión, función y heteromerización del receptor de cannabinoides CB₂ en el sistema nervioso central” se presenta como un compendio de publicaciones.

El manuscrito “**Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of Macaca fascicularis**” ha sido publicado en *Journal of Pshycopharmacology* con un factor de impacto de 3.8. El manuscrito “**Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in the brain**” ha sido aceptado y publicado online en *Journal of Biological Chemistry* previsto para su publicación en papel en Julio del 2012 y con un factor de impacto de 5.3. Finalmente el manuscrito “**Overexpression of cannabinoid receptor CB₂ mRNA impairs cranial nerve development in Xenopus laevis embryos**” está en vía de preparación para ser enviado a *Plos One* con un factor de impacto de 4.4.

En el trabajo “**Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of Macaca fascicularis**” la doctoranda Lucía Callén colaboró con el Dr José Luis Lanciengo y el Dr. Pedro Barroso-Chinea en la realización de las PCR. En el trabajo “**Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in the brain**” a excepción de la obtención de pinealocitos a partir de la glándula pineal y de cortes de tejido cerebral, la doctoranda Lucía Callén ha realizado la totalidad del trabajo experimental. Finalmente en el trabajo “**Overexpression of cannabinoid receptor CB₂ mRNA impairs cranial nerve development in Xenopus laevis embryos**” que se realizó a partir de una colaboración con el grupo de la Dr Nardi en la Universitat de Pisa, la doctoranda Lucía Callén con la colaboración de la doctoranda del grupo de la Dr Nardi, Giulia Marras, realizaron la totalidad de los experimentos a excepción de la inyección de los ovocitos de *Xenopus* que fue llevada a cabo por la Dr Michela Ori.

Barcelona, 18 de Junio del 2012

Dr. Enric I. Canela Campos

Dr. Rafael Franco Fernández

3.1. Expresión del mRNA codificante para el receptor de cannabinoides tipo 2 en el complejo palidal de *Macaca fascicularis*.

Publicado en *Journal of Psychofarmacology* (2011)1-8

José L. Lanciego^{1,2}, Pedro Barroso-Chinea^{1,2}, Alberto J. Rico^{1,2}, Lorena Conteperales^{1,2}, Lucía Callén^{2,3}, Elvira Roda^{1,2}, Virginia Gómez-Bautista^{1,2}, Iciar P. López^{1,2}, Carmen Lluís^{2,3}, José L. Labandeira-García^{2,4} and Rafael Franco^{1,2,3}

¹División de Neurociencias, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA y CIBERNED), Universidad de Navarra, Pamplona, España. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, CIBERNED, Universidad de Barcelona, España. ³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Barcelona, España ⁴Departamento de Ciencias Morfológicas, CIBERNED, Universidad de Santiago de Compostela, España.

La presencia de los receptores de cannabinoides tipo 2 (CB₂R) en el sistema nervioso central es todavía materia en controversia. Aunque, inicialmente, su expresión fue descrita en tejidos periféricos e inmunes, recientemente, es posible encontrar evidencias que sugieren la existencia de los CB₂R en células gliales e incluso neuronales. Aprovechando el diseño de nuevas sondas de mRNA de CB₂R y mediante técnicas de hibridación y PCR, hemos demostrado la existencia de transcritos de CB₂R en diversas áreas de cerebro del primate *Macaca fascicularis*, incluyendo la corteza cerebral y el hipocampo, así como ambas divisiones, externa e interna, del globo pálido, las cuales mostraron la mayor abundancia de transcritos de CB₂R. A este respecto, la presencia del RNA mensajero codificante para los CB₂R dentro del complejo palidal pone de relevancia a estos receptores como potenciales dianas para el tratamiento de desórdenes motores con origen en los ganglios basales.

Journal of Psychopharmacology

<http://jop.sagepub.com/>

Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*

José L Lanciego, Pedro Barroso-Chinea, Alberto J Rico, Lorena Conte-Perales, Lucía Callén, Elvira Roda, Virginia Gómez-Bautista, Iciar P López, Carmen Lluís, José L Labandeira-García and Rafael Franco

J Psychopharmacol 2011 25: 97 originally published online 20 May 2010

DOI: 10.1177/0269881110367732

The online version of this article can be found at:

<http://jop.sagepub.com/content/25/1/97>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:



British Association for Psychopharmacology

Additional services and information for *Journal of Psychopharmacology* can be found at:

Email Alerts: <http://jop.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://jop.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

>> Version of Record - Dec 22, 2010

OnlineFirst Version of Record - May 20, 2010

[What is This?](#)

Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*

José L Lanciego^{1,2}, Pedro Barroso-Chinea^{1,2}, Alberto J Rico^{1,2}, Lorena Conte-Perales^{1,2}, Lucía Callén^{2,3}, Elvira Roda^{1,2}, Virginia Gómez-Bautista^{1,2}, Iciar P López^{1,2}, Carmen Lluís^{2,3}, José L Labandeira-García^{2,4} and Rafael Franco^{1,2,3}

Journal of Psychopharmacology

25(1) 97–104

© The Author(s) 2011

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/0269881110367732

jop.sagepub.com



Abstract

The putative presence of the cannabinoid receptor type 2 (CB₂-R) in the central nervous system is still a matter of debate. Although first described in peripheral and immune tissues, evidence suggesting the existence of CB₂-Rs in glial cells and even neurons has been made available more recently. By taking advantage of newly designed CB₂-R mRNA riboprobes, we have demonstrated by *in situ* hybridization and PCR the existence of CB₂-R transcripts in a variety of brain areas of the primate *Macaca fascicularis*, including the cerebral cortex and the hippocampus, as well as in the external and internal divisions of the globus pallidus, both pallidal segments showing the highest abundance of CB₂-R transcripts. In this regard, the presence of the messenger coding CB₂-Rs within the pallidal complex highlights their consideration as potential targets for the treatment of movement disorders of basal ganglia origin.

Keywords

Basal ganglia, brain, endocannabinoids, *in situ* hybridization, levodopa

Introduction

At present, two different cannabinoid receptors have been properly characterized and named as types 1 (CB₁) and 2 (CB₂) of the cannabinoid receptor (Howlett et al., 2002; Pertwee, 1995). The CB₁ receptor (CB₁-R) is widely expressed in the central nervous system (CNS) (Freund et al., 2003), whereas the CB₂ receptor (CB₂-R) has been primarily identified in tissues other than the CNS such as the spleen and thymus, as well as in several circulating immune cell populations (Klein et al., 2003). Furthermore, two isoforms for CB₂-R have been recently characterized and named CB₂A-R and CB₂B-R (Liu et al., 2009). CB₂A-R has a preferential expression in testis and brain, whereas a higher CB₂B-R expression is found in the spleen. Experimental evidence has challenged the current view on the complementary distribution of CB₁-Rs and CB₂-Rs by showing that CB₂-Rs are also present in the CNS, albeit to a lower level of expression than CB₁-Rs (for a recent review, see Svizenska et al., 2008). The existence of CB₂-R in the CNS has been more recently demonstrated in a variety of neuronal (Beltramo et al., 2006; Brusco et al., 2008a,b; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Skaper et al., 1996; Ständer et al., 2005; Van Sickle et al., 2005; Wotherspoon et al., 2005) and non-neuronal populations (Ashton et al., 2006; Benito et al., 2003; Brusco et al., 2008a,b; Golech et al., 2004; Kearn and Hilliard, 1997; Maresz et al., 2005; Nuñez et al., 2004; Stella, 2004).

Another interesting feature characterizing CB₁-Rs and CB₂-Rs is their differential subcellular localization, an issue that is likely to have important implications on the therapeutic potential of cannabinoids. For instance, whereas CB₁-Rs are predominantly expressed at the pre-synaptic level (Maldonado et al., 2006), CB₂-Rs show a preferred post-synaptic localization (Brusco et al., 2008a,b; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006). Furthermore, the potential choice of CB₂-Rs as promising targets for glial-dependent neurodegenerative processes has been recently highlighted (Ashton and Glass, 2007; Fernández-Ruiz et al., 2008).

¹Neurosciences Division, Center for Applied Medical Research (CIMA and CIBERNED), University of Navarra Medical College, Pamplona, Spain.

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, CIBERNED, University of Barcelona, Spain.

³Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Spain.

⁴Department of Morphological Sciences, CIBERNED, University of Santiago de Compostela, Spain.

Corresponding author:

José L Lanciego, Neurosciences Division, Center for Applied Medical Research (CIMA and CIBERNED), University of Navarra Medical College, Pio XII Ave 55, 31008 Pamplona, Navarra, Spain
Email: jlanciego@unav.es

Table 1. Primers used in polymerase chain reaction

Genes	Reference gene (human)	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	cDNA product
Cannabinoid CB2 receptor	NM_001841	GCTGGGTGACAGAGATAGCC	GCTGAGAGGACCCACATGAT	475 pb
GAPDH	NM_002046	CATCTGCACCCACCAACTGCTTAG	GCCTGCTTACCACCTTCTTGATG	343 pb

The presence of CB₂-Rs within neurons in the CNS is still a controversial issue. The neuronal expression of CB₂-Rs has been mainly addressed by using antibodies directed towards CB₂-Rs (Brusco et al., 2008a,b; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Van Sickle et al., 2005; Wotherspoon et al., 2005). Since CB₂-Rs are expressed at lower levels when compared with those of CB₁-Rs, the sensitivity of indirect immunohistochemical methods often barely reaches the detection threshold and therefore may not suffice to accurately assess the existence of CB₂-Rs within neurons in the CNS. In an attempt to provide some clues in this controversy, here we have followed a different strategy and, instead of relying on the immunohistochemical detection of CB₂-Rs, we have conducted in situ hybridization (ISH) procedures using newly designed riboprobes for CB₂-R-specific mRNA. By taking advantage of the superior sensitivity of ISH when compared with antibody-based detection, we have been able to demonstrate the presence of CB₂-R transcripts within neurons in several brain areas of primates, including the cerebral cortex, the hippocampus and the pallidum complex, the latter showing the highest abundance of CB₂-R transcripts.

Materials and methods

Five young adult male *Macaca fascicularis* primates (body weight ranging from 3.8 to 4.5 kg) were used in this study. Animals were handled at all times according to the European Council Directive 86/609/EEC, as well as in agreement with the Society for Neuroscience Policy on the Use of Animals in Neuroscience Research. The experimental design was approved by the Ethical Committee for Animal Testing of the University of Navarra (ref: 037/2000).

Polymerase chain reaction

Animals were sacrificed by decapitation; their brains were rapidly removed and dissected using a brain blocker. The coordinates for the brain blocks were taken from the stereotaxic atlas of Martin and Bowden (1997). The brain block containing the globus pallidus internal (GPi) and external (GPe) nuclei were rapidly frozen on isopentane cooled with liquid nitrogen, and coronal sections (20 µm thick) through both nuclei were obtained in a cryostat. The sections were mounted on dedicated plastic-coated slides (Leica) for laser-guided capture microdissection (LCM). Under the LCM microscope, the boundaries of the GPi and GPe nuclei were delineated and then dissected out from the tissue using the laser beam. The tissue samples obtained from both nuclei were collected in 0.5 mL Eppendorf vials containing lysis buffer for RNA extraction. Spleen homogenates were used as control for cannabinoid CB₂-R expression. Total RNA was extracted using the Absolutely RNA[®]

nanoprep kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and including the optional DNase I digestion step. The RNA was eluted in a final volume of 10 µL, and it was all used for reverse transcription reactions. The cDNA template was obtained by adding 1 µL 10 mM dNTP mix, 1 µL 0.1 M DTT, 50 ng hexamers, 1 µL RNase inhibitor (40 U/µL; Promega, Madison, WI, USA), 4 µL 5× First-Strand Buffer, 2 µL sterile water and 1 µL SuperScript III reverse transcriptase (200 U/µL; Invitrogen) in a final volume of 20 µL and incubated at 50°C for 60 min. Subsequently, the reaction was inactivated by heating at 70°C for 15 min. Polymerase chain reactions (PCRs) were carried out in a final volume of 50 µL containing 10 µM of each primer (the primers used in PCR are illustrated in Table 1), 0.5 µL of Taq-DNA polymerase (Bioline), 5 µL 10× Taq DNA polymerase PCR buffer, 1.5 µL Mg Cl₂, 2 µL dNTP and 6 µL per reaction of pure cDNA for the amplification of the cannabinoid CB₂-R gene, and 3 µL of cDNA GAPDH. After 94°C for 5 min, the thermocycling parameters were as follows: 35 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 1 min. The extension reaction was carried out for 10 min at 72°C, and reaction products were stored at 4°C.

Synthesis of the riboprobe

Total RNA was isolated from a *Macaca fascicularis* spleen sample by using the Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The spleen sample was disrupted in 1 mL Trizol reagent using a homogenizer. After 5 min incubation at room temperature, 0.2 mL of chloroform was added and mixed vigorously; the sample was then centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C. Following centrifugation, the supernatant was placed in a new tube, and 0.5 mL isopropanol was added followed by incubation at room temperature (10 min). The RNA pellet was obtained by centrifugation at 12,000 g for 10 min at 4°C. The pellet was washed in 1 mL 75% ethanol and, after vaporization of ethanol, dissolved in 30 µL diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water. Absorbance at 260 nm was determined to quantify the amount of total RNA, which was kept at -80°C. First-strand cDNA was synthesized from the total RNA extracted and 0.5 µg of total RNA was subjected to PCR by adding Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) (1 µL, 200 U/µL), oligo-(dT) (1 µL, 50 µM), buffer (4 µL, 5× First-Strand Buffer: 200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 50 mM MgCl₂), dithiothreitol (1 µL, 0.1 M), and mixed dNTPs (1 µL, 10 mM; Invitrogen) in a total volume of 20 µL made by adding DEPC-treated water.

Oligonucleotide primers were designed using Primer3Input v. 0.4.0 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) specific to human cannabinoid CB₂-R: forward primer 5'-CATCACTGCCTGGCTCACT-3' and

reverse primer 5'-AGCATAGTCCTCGGTCCTCA-3'. Template cDNA sequence of CB2-R was obtained from GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). PCR was performed with Pfx polymerase (Invitrogen) and 35 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 58°C for 30 s, extension at 68°C for 1 min) and a final extension at 68°C for 10 min. The PCR product (662 nucleotides in length) was analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel containing SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) under ultraviolet light. The cDNA fragment was purified by a Montage PCR Centrifugal Filter Device (Millipore, Bedford, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. The cDNA sample was purified using a QIAquick Gel Extraction kit (50) (QIAGEN GmbH).

The PCR product was later inserted into the plasmid vector (pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]; Invitrogen) and used to transform competent *E. coli* cells (Invitrogen). The product from the miniprep was then sequenced (3130XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems). The computer-assisted homology searches (see <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) conducted showed that the CB2-R cDNA sequence had 94% homology with human CB2-R (NM_001841) and 99% homology with *Macaca mulata* CB2-R (accession number XM_001105018) sequences, without any significant homology with CB1-R for the different species: human CB1-R transcript variant 1 (accession number NM_016083) and variant 2 (accession number NM_033181) or *Macaca mulata* CB1-R (accession number NM_001032825). Furthermore, the designed probe recognizes both CB2A-R and CB2B-R isoforms which have been recently reported by Liu et al. (2009).

Sense and antisense riboprobes for *Macaca fascicularis* cannabinoid CB2-R were transcribed from the Zero Blunt TOPO PCR cloning kit plasmid. The plasmid was linearized and the sense or antisense probes were transcribed with the appropriate RNA polymerases (Boehringer Mannheim, Germany). The transcription mixture included 1 µg template plasmid, 1 mM each of ATP, CTP and GTP, 0.7 mM UTP, and 0.3 mM digoxigenin-UTP, 10 mM DTT, 50 U RNase inhibitor, and 1 U of either T7 or SP6 RNA polymerase in a volume of 50 µL. After 2 h at 37°C, the template plasmid was digested with 2 U RNase-free DNase for 30 min at 37°C. The sense and antisense riboprobes were then precipitated by the addition of 100 µL of 4 M ammonium acetate and 500 µL of ethanol, and they were recovered by centrifugation at 4°C for 30 min. The quality of the synthesis was monitored by dot blot.

Tissue processing I: Single colorimetric in situ hybridization

For ISH, three monkey brains were used. These primates were anaesthetized with an overdose of chloral hydrate and perfused transcardially. The perfusates consisted of a saline Ringer solution, immediately followed by 3 L of cold fixative containing 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.125 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Next, the perfusion was continued using 1 L of a cryoprotective solution containing 10% glycerin and 1% dimethylsulphoxide (DMSO) in 0.125 M PB, pH 7.4. After the perfusion, the skull was

opened and the brain removed. Tissue blocks (15 mm thick) were stored for 48 min in a cryoprotective solution containing 20% glycerin and 2% DMSO in 0.125 M PB, pH 7.4. All the solutions used for fixation and cryoprotection were treated with 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) and autoclaved prior to their use. Finally, frozen coronal sections (40 µm thick) were obtained using a sliding microtome and collected in 0.125 M PB, neutral pH.

Single ISH procedures were carried out in free-floating sections that were incubated twice in 0.1% DEPC in PB for 15 min and then pre-equilibrated for 10 min in 5× SSC (0.75 M NaCl, 0.0075 M Na-citrate). The sections were then pre-hybridized at 58°C for 2 h in a hybridization solution containing 50% deionized formamide, 5× SSC and 40 µg/mL of denatured salmon DNA in H₂O-DEPC. Subsequently, Sense and antisense digoxigenin-labelled probes were denatured for 5 min at 80°C, added to the hybridization mix at 400 ng/mL and the sections were hybridized in this solution for 16 h at 58°C. Post-hybridization washes were carried out in 2× SSC at room temperature (RT) for 30 min, 2× SSC for 1 h at 65°C, and then in 0.1× SSC for 1 h at 65°C. The digoxigenin-labelled probes were visualized by firstly pre-equilibrating the sections in TN buffer (0.1 M Tris/HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl) before incubating them for 90 min at RT with an alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody raised in sheep (1:1500 in 0.5% TN-blocking reagent). After several rinses in TN buffer, the sections were equilibrated for 5 min in TNM buffer (0.1 M Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl₂, pH 9.5), and they were then incubated for 7 h in the substrate solution (0.02% of NBT-BCIP in TNM buffer). Staining was stopped by washing repeatedly in a rinsing solution (0.01 M Tris/HCl and 0.001 M EDTA, pH 8). The sections were then mounted on slides, air-dried, dehydrated in ethanol, cleared in xylene and coverslipped with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

Tissue processing II: Dual fluorescent visualization of CB₂-R mRNA expression combined with neuronal markers in the pallidal complex

The sections processed to detect digoxigenin-labelled CB₂-R riboprobes using an anti-digoxigenin antibody raised in sheep (1:1500 Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, IN, USA) that was visualized with the HNPP fluorescent detection kit (Roche Diagnostics). The sections were then processed for the immunofluorescent detection of either NeuN (vertebrate neuron-specific nuclear protein) or parvalbumin (PV). The immunofluorescent detection of NeuN was achieved by incubating the sections with a mouse anti-NeuN antibody (1:1000, Chemicon) for 24 h at 4°C followed by an Alexa[®]488-coupled goat anti-mouse IgG (1:200, Molecular Probes) for 2 h at room temperature. The immunofluorescent detection of PV was carried out by incubating the sections in a mouse anti-PV (1:2000; Sigma) for 24 h at 4°C. The sections were incubated with a secondary antibody comprising Alexa[®]488-coupled goat anti-rabbit IgG (1:200, Molecular Probes). The sections were finally mounted on glass slides using a 2% solution of gelatin in 0.05 M Tris/HCl (pH 7.6),

dried at room temperature, dehydrated in toluene and cover-slipped with DPX. The obtained material was inspected under a Zeiss 510 Meta confocal microscope. In order to ensure the appropriate visualization of labelled elements and to avoid false positive results, the emission from the argon laser at 488 nm was filtered through a band-pass filter of 505–530 nm and colour-coded in green. The emission following the excitation with the helium laser at 543 nm was filtered through a band-pass filter of 560–615 nm and colour-coded in red.

Results

In the present study, the presence of the mRNA coding CB₂-R in the primate CNS was assessed by PCR and by ISH. The PCR analysis was conducted by using microdissected tissue samples obtained from the internal and external segments of the globus pallidus (GPi and GPe, respectively) and compared with the bands gathered from spleen homogenates (Figure 1). The designed primers showed the presence of CB₂-R in the spleen (used as a control organ) and in GPi and GPe. Furthermore, following hybridization with the antisense riboprobe, a moderate amount of labelling was observed in several brain areas, including the hippocampus, cerebral cortex and both GPi and GPe (Figure 2). As illustrated in Figure 2B, hybridization with the sense riboprobe resulted in a complete lack of stain. At the level of the hippocampus (Figure 2A) and in keeping with existing knowledge (Suárez et al., 2009), expression of CB₂-Rs was mainly found in cells with interneuron-like phenotypes that were mainly located in CA1 and CA3 territories. A moderate expression of CB₂-R mRNA also characterized neurons with a pyramidal-like phenotype within layers III and V of the cerebral cortex (Figure 2C). Finally, the strongest expression of CB₂-R mRNA was consistently found in both GPi and GPe. The conducted colorimetric ISH stains revealed the presence of CB₂-R transcripts throughout the cytoplasm of pallidal cells, without any kind of stain at the level of cellular nuclei (Figure 2D and 2E).

The neuronal identity of cells expressing CB₂-R transcripts within GPi and GPe was assessed by combining fluorescent ISH for CB₂-R mRNA with two well-known neuronal markers, those comprising the calcium-binding protein PV (a marker for GABAergic pallidal neurons) as well as the vertebrate neuron-specific nuclear protein (NeuN). All pallidal neurons showing PV immunoreactivity also contain CB₂-R transcripts, although a small fraction of pallidal cells expressing CB₂-R mRNA lack PV stain (Figure 2). This is consistent with the fact that the globus pallidus also contains neurons expressing markers other than PV, such as cholinergic, nitrergic and glutamatergic neurons (Barroso-Chinea et al., 2008; Geisler et al., 2007; Hur and Zaborszky, 2005; Kha et al., 2000; Parent et al., 1981). Furthermore, the ultimate confirmation of the neuronal identity of pallidal cells expressing CB₂-R transcripts was achieved by combining fluorescent ISH with the immunofluorescent detection of NeuN. As illustrated in Figure 3, all pallidal neurons showing NeuN immunofluorescence are found to express CB₂-R mRNA.

Discussion

We describe here the expression of the mRNA that codes for CB₂-Rs in a variety of brain areas of the primate *Macaca fascicularis*, with emphasis on the expression within the pallidal complex (GPi and GPe) of the basal ganglia. The presence of CB₂-R transcripts in both subdivisions of the globus pallidus was assessed by PCR as well as by colorimetric ISH. Furthermore, the neuronal identity of pallidal cells expressing CB₂-R mRNA has been unequivocally addressed by co-localization studies carried out under the confocal laser-scanning microscope.

Expression of CB₂-Rs within neurons in the central nervous system of the primate

Contrary to the prevailing view that the presence of CB₂-Rs is restricted to peripheral tissues, our data support the existence

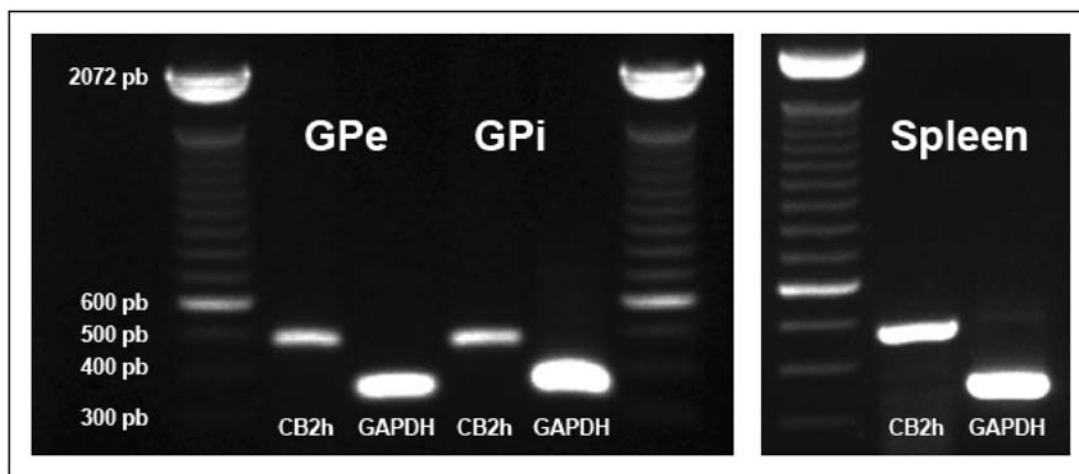


Figure 1. PCR showing the presence of CB₂-R product in microdissected tissue samples taken from GPe and GPi. GAPDH is the control gene.

of CB₂-Rs in neurons from the CNS of non-human primates. The most noticeable expression was found in the hippocampus, pyramidal layers III and V of the cerebral cortex and in both divisions of the globus pallidus (GPi and GPe). These results are in keeping with those reported in rodents (Brusco et al., 2008a,b; Gong et al., 2006) that were mainly gathered from antibody-based indirect immunohistochemical detection. Moreover, the fact that antibodies were used in most of the studies showing neuronal expression of CB₂-Rs in the CNS (Brusco et al., 2008a,b; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Van Sickle et al., 2005; Wotherspoon et al., 2005) has paved the way for the ongoing cannabinoid controversy (reviewed in Svizenska et al., 2008). This controversy is boosted by the apparent lack of psychoactive effects for compounds directed towards CB₂-Rs, in keeping with the non-neuronal expression of CB₂-Rs within the CNS. In other words, a CB₂-mediated psychoactivity would require neuronal expression of CB₂-Rs. For instance, Malan et al. (2002) have reported that pain responses were inhibited by

CB₂-R activation without the psychotropic effects produced by CB₁-R agonists.

Furthermore, one of the most important issues sustaining putative therapeutic approaches based on cannabinoids is represented by the differential subcellular localization of CB₁-Rs and CB₂-Rs. On the one hand, there is general consensus on the pre-synaptic localization of CB₁-Rs; their main role would therefore be to inhibit neurotransmitter release, as reported for glutamate (Shen et al., 1996), acetylcholine (Gifford et al., 1997) and noradrenaline (Schlicker et al., 1997). On the other hand, the preferential post-synaptic localization of CB₂-Rs was initially suggested by Gong et al. (2006), and later confirmed by Brusco et al. (2008a,b). It should be noted that CB₂-Rs were also found within unmyelinated axons in the substantia nigra, thus likely to account for a pre-synaptic distribution, although these receptors were not found in axon terminals (Brusco et al., 2008a). The pre- or post-synaptic distribution of CB₂-Rs can be neither confirmed nor denied by our results, since the data

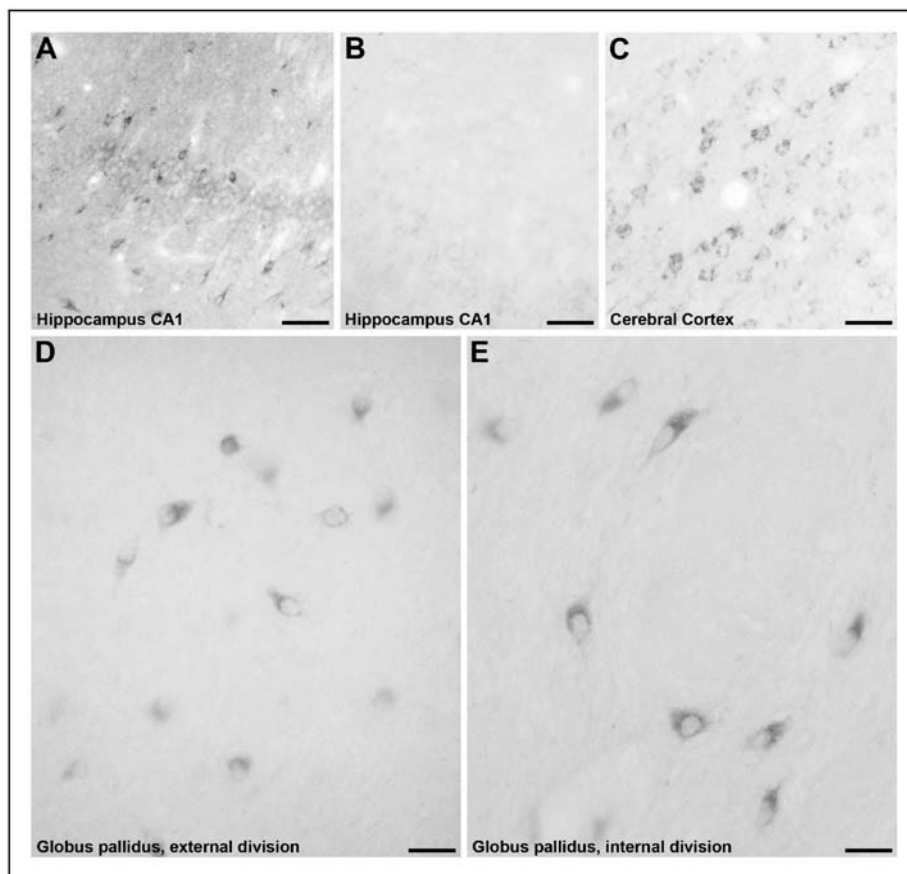


Figure 2. Single colorimetric in situ hybridization showing the expression for CB₂-R mRNA in the brain of *Macaca fascicularis*. (A) At the level of the hippocampus, the hybridization with the antisense riboprobe resulted in moderate stain in cellular profiles with interneuron-like morphologies within CA1 territory. Scale bar: 180 μ m. (B) The hybridization with the sense riboprobe resulted in a total lack of stain at the level of hippocampal CA1 territory. Scale bar: 180 μ m. (C) A moderate expression of CB₂-R mRNA was observed in neurons with pyramidal phenotype within layer V of the cerebral cortex. Scale bar: 100 μ m. (D and E) Cellular expression of CB₂ mRNA within the external and internal divisions of the globus pallidus (D and E, respectively). Pallidal cells were characterized by a clear expression of CB₂ mRNA distributed throughout the entire cytoplasm without any kind of nuclear stain. Scale bar is 45 μ m for panel D and 35 μ m for panel E.

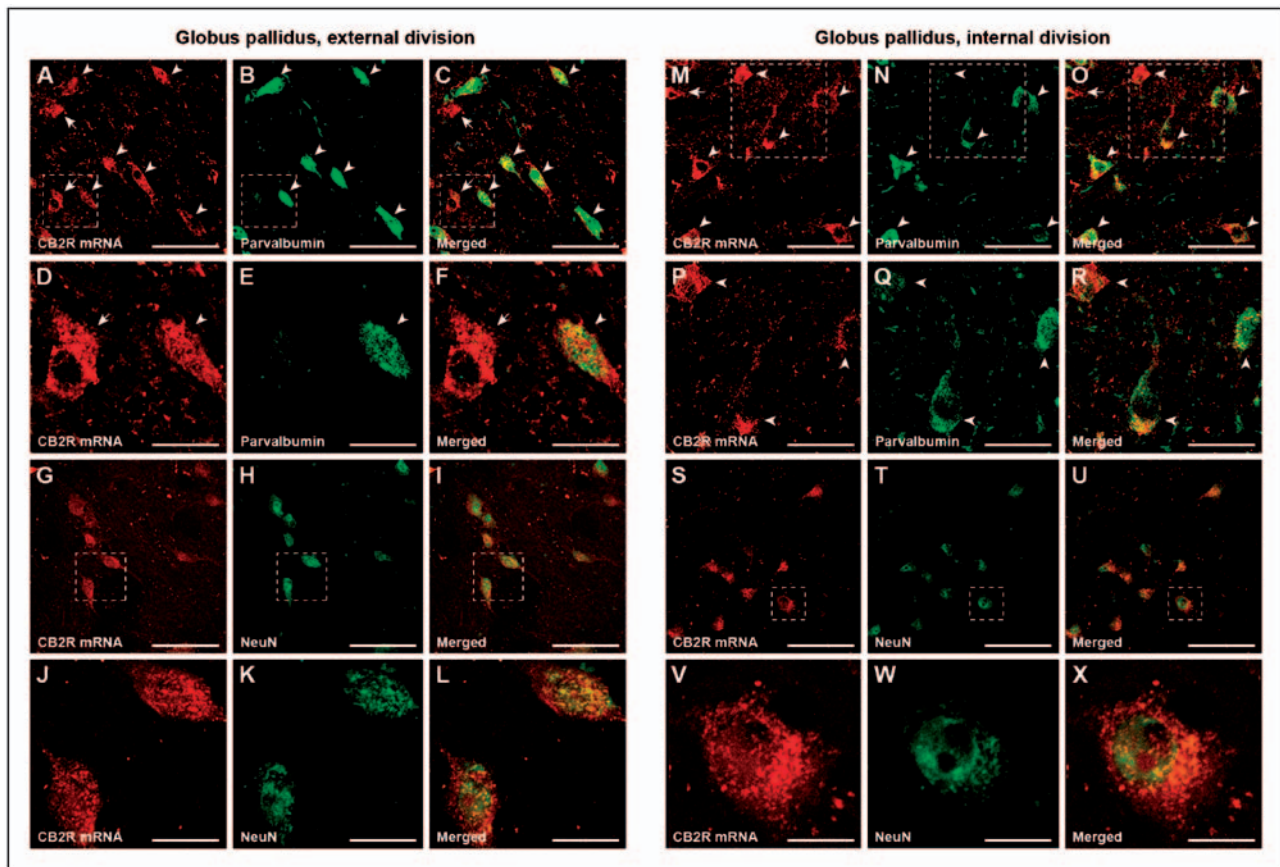


Figure 3. Dual fluorescent detection of CB₂-R mRNA and neuronal markers showing the neuronal identity of cellular profiles expressing CB₂-R transcripts. (A–F) Co-expression of CB₂-R transcripts (red channel) and parvalbumin (PV, green channel) within neurons in the external division of the globus pallidus (GPe). Although most of the PV-positive neurons also expressed CB₂-R mRNA (arrowheads), a small number of GPe neurons containing CB₂-R transcripts did not show PV stain (arrows). Scale bar is 120 μ m for panels A–C and 30 μ m in panels D–F. (G–L) Co-localization of CB₂-R mRNA and NeuN in GPe neurons. All neurons positive for NeuN also contained CB₂-R transcripts. Scale bar is 100 μ m for panels G–I and 25 μ m in panels J–L. (M–R) Co-expression of CB₂-R transcripts (red channel) and parvalbumin (PV, green channel) within neurons in the internal division of the globus pallidus (GPi). Although most of the PV-positive neurons also expressed CB₂-R mRNA (arrowheads), a small number of GPi neurons containing CB₂-R transcripts did not show PV stain (arrows). Scale bar is 90 μ m for panels M–O and 45 μ m in panels P–R. (S–X) Co-localization of CB₂-R mRNA and NeuN in GPi neurons. All neurons positive for NeuN also contained CB₂-R transcripts. Scale bar is 130 μ m for panels S–U and 15 μ m in panels V–X.

presented here were gathered from ISH procedures. In other words, synthesized CB₂-Rs could: (i) be transported anterogradely to the distal axon terminals (suggesting a pre-synaptic distribution); (ii) remain in close vicinity to the place of synthesis to be further incorporated to the plasma membrane of the parent cell body and dendrites (therefore sustaining a post-synaptic distribution); or (iii) a combination of these two possibilities.

Cannabinoids for the treatment of movement disorders of basal ganglia origin

Accumulating evidence supports the brain expression of CB₂-Rs in microglial cells (reviewed in Ashton and Glass, 2006), therefore supporting the use of CB₂ as a promising pharmacological target for neurodegenerative processes in which inflammation and cytotoxic events are known to play a crucial role (Fernández-Ruiz et al., 2008). For instance, activation of

CB₂-Rs by cannabinoids has been implicated in the neuroprotective outcome observed in the rat model of parkinsonism (García-Arencibia et al., 2007).

Besides considering CB₂-Rs for inflammatory-triggered neurodegenerative processes, the expression of CB₂-Rs within pallidal neurons opens new vistas on the potential use of cannabinoids for the treatment of basal ganglia disorders. Neurons in GPi give rise to the basal ganglia output through the pallidothalamic pathway, a GABAergic inhibitory pathway that funnels basal ganglia information through the thalamus to the cerebral cortex. According to the basal ganglia model (Albin et al., 1989; Crossman, 1987; DeLong, 1990), pallidothalamic-projecting neurons are hyperactive following dopaminergic depletion (more inhibition reaching the thalamic-recipient areas of GPi efferent neurons). This hyperactivity is sustained by two synergistic mechanisms: on the one hand, GPi neurons receive smaller amounts of GABA, i.e., 'less inhibition', from the striatopallidal-projecting neurons. On the other hand, GPi neurons receive an increased

amount of glutamate coming from hyperactive subthalamic neurons, i.e., 'more excitation. In this context, the potential use of specific compounds (agonists and antagonists) directed towards CB₂-Rs would mainly be dependent on the pre- or post-synaptic localization of CB₂-Rs. Assuming that pre-synaptic CB₂-Rs would behave the same way as pre-synaptic CB₁-Rs, then a CB₂-Rs agonist would probably restore basal ganglia output to baseline conditions. In this regard, it is also worth noting that involvement of the endocannabinoid system in the pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias has been postulated (Ferrer et al., 2003). Indeed, the severity of levodopa-induced dyskinesias is attenuated following the treatment with rimonabant, a CB₁-R antagonist that also blocks CB₂-Rs at high doses (Pertwee, 1999). If CB₂-Rs are post-synaptically located we would be facing a more complex scenario, probably depending not only on the neurotransmitter involved, but also on receptor–receptor interactions at the level of the postsynaptic membrane.

Acknowledgements

We thank J Daniels for his assistance during the preparation of the manuscript. This work was supported by ERANET-NEURON (Ref. 'Heteropark'), Ministerio de Ciencia e Innovación (Grants No. SAF2008-03118-E and SAF2009-07276), Ministerio de Educación (grant No. BFU2009-08351), CiberNed, Departamento de Salud, Gobierno de Navarra, and by the UTE-project/FIMA.

References

- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12: 366–375.
- Ashton JC, Glass M (2007) The cannabinoid CB₂ receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* 5: 73–80.
- Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF (2006) Expression of the cannabinoid CB₂ receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 396: 113–116.
- Barroso-Chinea P, Rico AJ, Pérez-Manso M, et al. (2008) Glutamatergic pallidothalamic projections and their implications in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 31: 422–432.
- Beltramo M, Bernardini N, Bertorelli R, et al. (2006) CB₂ receptor-mediated antihyperalgesia: Possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur J Neurosci* 23: 1530–1538.
- Benito C, Núñez E, Tolón RM, et al. (2003) Cannabinoid CB₂ receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 23: 11136–11141.
- Brusco A, Tagliaferro PA, Saez T, Onaivi ES (2008a) Ultrastructural localization of neuronal brain CB₂ cannabinoid receptors. *Ann NY Acad Sci* 1139: 450–457.
- Brusco A, Tagliaferro P, Saez T, Onaivi ES (2008b) Postsynaptic localization of CB₂ cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse* 62: 944–949.
- Crossman AR (1987) Primate models of dyskinesia: the experimental approach to the study of basal ganglia-related involuntary movement disorders. *Neuroscience* 21: 1–40.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13: 266–271.
- Fernández-Ruiz J, Pazos MR, García-Arencibia M, Sagredo O, Ramos JA (2008) Role of CB₂ receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Molec Cell Endocrinol* 286S: S91–S96.
- Ferrer B, Asbrock N, Kathuria S, Piomelli D, Guiffrida A (2003) Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur J Neurosci* 18: 1607–1614.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83: 1017–1066.
- García-Arencibia M, González S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J (2007) Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res* 1134: 162–170.
- Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS (2007) Glutamatergic afferents to the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* 27: 5730–5743.
- Gifford AN, Samiiian L, Gatley SJ, Ashby CR (1997) Examination of the effect of the cannabinoid receptor agonists, CP55, 940, on electrically evoked transmitter release from rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 324: 187–192.
- Golech SA, McCarron RM, Chen Y, et al. (2004) Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Mol Brain Res* 132: 87–92.
- Gong J-P, Onaivi ES, Ishiguro H, et al. (2006) Cannabinoid CB₂ receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071: 10–23.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, et al. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161–202.
- Hur EE, Zaborszky L (2005) Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization. *J Comp Neurol* 483: 351–373.
- Kearn CS, Hilliard CJ (1997) Rat microglial cell express the peripheral-type cannabinoid receptor (CB₂) which is negatively coupled to adenylyl cyclase. *Proceedings of the Symposium on the Cannabinoids, Burlington, Vermont, International Cannabinoid Research Society*, 57.
- Kha HT, Finkelstein DJ, Pow DW, Lawrence AJ, Horne MK (2000) Study of projections from the entopeduncular nucleus to the thalamus of the rat. *J Comp Neurol* 426: 366–377.
- Klein TW, Newton C, Larsen K, et al. (2003) The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 74: 486–496.
- Liu Q-R, Pan C-H, Hishimoto A, et al. (2009) Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB₂ isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes Brain Behav* 8: 519–530.
- Malan Jr TP, Ibrahim MM, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F (2002) Inhibition of pain responses by activation of CB₂ cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 121: 191–200.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* 29: 225–232.
- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN (2005) Modulation of the cannabinoid CB₂ receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 95: 437–445.
- Martin RF, Bowden DM (1997) *Template Atlas of the Primate Brain*. Seattle: University of Washington.
- Núñez E, Benito C, Pazos MR, et al. (2004) Cannabinoid CB₂ receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53: 208–213.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong J-P, et al. (2006) Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB₂ receptors in brain. *Ann NY Acad Sci* 1074: 514–536.
- Parent A, Gravel S, Boucher R (1981) The origin of forebrain afferents to the habenula in rat, cat and monkey. *Brain Res Bull* 6: 23–38.

- Pertwee RG (1995) *Cannabinoid Receptor Ligands*. London: Academic Press.
- Pertwee RG (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6: 635–664.
- Schlicker E, Timm J, Zentner J, Göthert M (1997) Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356: 583–589.
- Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16: 4322–4334.
- Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, et al. (1996) The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 30: 3984–3989.
- Ständer S, Schmelz M, Metz D, Luger T, Rukwied R (2005) Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory motor nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J Dermatol Sci* 38: 177–188.
- Stella N (2004) Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* 48: 267–277.
- Suárez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, et al. (2009) Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* 19: 623–632.
- Svízenska I, Dubový P, Sulcová A (2008) Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures – a short review. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 501–511.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, et al. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science* 310: 329–332.
- Wotherspoon G, Fox A, McIntyre S, Colley S, Bevan S, Winter J (2005) Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience* 135: 235–245.

3.2. La sobreexpresión del mRNA de los receptores de cannabinoides CB₂ impide el correcto desarrollo de los nervios craneales en embriones de *Xenopus laevis*.

Manuscrito enviado para revisión a Plos One

Lucía Callén¹, Giulia Marras², Vicent Casadó¹, Antoni Cortés¹, Josefa Mallol¹, Carme Lluís¹, Enric I. Canela¹, Michela Ori², Rafael Franco^{1&}, Irma Nardi², Peter J. McCormick¹

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona, España y Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).* ²*Unidad de Biología Celular, Universidad de Pisa, Pisa I-56127, Italia.*

[&]*Dirección actual: Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain.*

Los cannabinoides juegan un papel relevante en el cerebro interactuando, principalmente, sobre sus receptores más abundantes, los receptores CB₁. Recientemente, se ha descubierto la expresión neuronal de los receptores CB₂, pero el estudio sobre su posible papel en el cerebro es todavía una cuestión incipiente. A este respecto, todavía no se conoce la posible implicación del receptor CB₂ durante el desarrollo cerebral. En este trabajo hemos utilizado el modelo de desarrollo neural de *Xenopus laevis* para estudiar el papel de los receptores CB₂ en este proceso mediante estudios de ganancia de función *in vivo*. Hemos demostrado, por primera vez, la relación entre la sobreexpresión del receptor CB₂, pero no la del CB₁, y la alteración en el desarrollo de los nervios craneales maxilomandibular (VII), glossofaríngeo (IX) y vagal (X), mediante un proceso que implica una señalización diferencial, activando la ruta de la Akt al tiempo que se inhibe la ruta de las ERK1/2 MAPK y se induce una regulación incrementada de los genes implicados en el desarrollo de las placodas y los nervios craneales. Concretamente, la sobreexpresión de genes tales como *wnt8*, *pax2*, *pax3* y *fgf8*, concomitante a la sobreexpresión de CB₂, puede mantener, más allá de lo deseado, el estado proliferativo de las células progenitoras de la placoda epibranchial. Los resultados indican que los receptores CB₂ pueden desregular los mecanismos que controlan el cambio de un estado proliferativo a un estado de diferenciación de estas células impidiendo la correcta diferenciación de las mismas.



Overexpression of cannabinoid receptor CB₂ mRNA impairs cranial nerve development in *Xenopus laevis* embryos

Lucía Callén¹, Giulia Marras², Vicent Casadó¹, Antoni Cortés¹, Josefa Mallol¹, Carme Lluís¹, Enric I. Canela¹, Michela Ori², Rafael Franco^{1&}, Irma Nardi², Peter J. McCormick¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).

³Cellular Biology Unit, Department of Biology, University of Pisa, Pisa I-56127, Italy

[&]Present adress: Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain.

Abstract

Cannabinoids play a relevant role in the brain by mainly interacting with the most abundant CB₁ receptors. Recently, neuronal expression of cannabinoid CB₂ receptors has been discovered but the study of the role they play in brain is still nascent. In this respect, nothing is known about the CB₂ receptor implications in brain development. We have used a *Xenopus laevis* embryo model of neural development to study the role of CB₂ receptors in this process by means of gain of function *in vivo* studies. Here, for the first time, we show a relationship between CB₂ but not CB₁ receptor overexpression and strong impairment of maxillomandibular (VII), glossopharyngeal (IX) and vagal (X) cranial nerves development by a process that imply a differential signaling activating the Akt pathway whilst inhibiting the ERK 1/2 MAPK pathway and inducing an up regulation of genes involved in placodal and cranial nerve development. Specifically, the up-regulation of *wnt8*, *pax2*, *pax3* or *fgf8* genes upon CB₂ receptor expression may lead to maintain a proliferative state along time in stem cells of epibranchial placode. Our results indicate that CB₂ receptors can interrupt the timing switch in cell fate and preventing neural differentiation of stem cells.

INTRODUCTION

There are two known cannabinoid receptors, CB₁ and CB₂ with strong evidence of a new subtype, GPR55, that are mediating the effect of endocannabinoids and have been considered as therapeutic targets for different disorders (Romero et al., 2002; Baker et al., 2003; Di Marzo et al., 2004; Mackie, 2006; Little et al., 2011). Acting through these receptors, endocannabinoids heavily influence cardiovascular and

immune systems as well as control progenitor cell proliferation (Klein et al., 2003; Aguado et al., 2005; Mackie and Stella, 2006). The CB₁ receptor is the most abundant receptor in the central nervous system (CNS) controlling mood and emotion and playing a role in the modulation of memory processing, and on metabolism (Zanettini et al., 2011). CB₁ receptors have been described to have an important role during CNS patterning (Harkany et al., 2007; Berghuis et al., 2007; Mulder et al., 2008; Galve-Roperh et al., 2009). Moreover, CB₁, but not CB₂ receptors, mediate psychoactivity (Palazuelos et al., 2006; Fernández-Ruiz et al., 2007). CB₁ receptor has been previously cloned and characterized in *Xenopus laevis* CNS with a similar CB₁ mRNA distribution as in mammals (Cottone et al., 2003). In contrast, CB₂ receptors were traditionally thought to be only expressed in peripheral tissue where it can help control inflammation and various immunological responses (Klein et al., 2003), but recently, they can also be found in the brain in a lower expression level than CB₁ receptors (Svízenská et al., 2008). Multiple studies have demonstrated CB₂ receptor expression in different non-neuronal (Ashton et al., 2006; Brusco et al., 2008b; Golech et al., 2004; Maresz et al., 2005) and neuronal populations (Van Sickle et al., 2005; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Brusco et al., 2008b; a; Lanciego et al., 2011). Furthermore, two isoforms for CB₂ receptors have been recently characterized and named CB_{2A} and CB_{2B} (Liu et al., 2009) being CB_{2A} preferentially expressed in testis and brain, whereas CB_{2B} expression is found in the spleen. At the signal level, CB₂ receptors are members of the GPCR family and are Gi/Go-protein-coupled receptors (Pertwee, 1997). Agonist activation triggers inhibition of adenylyl cyclase and voltage-gated calcium channels, activation of potassium channels, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt signaling pathways (Gómez del Pulgar et al., 2000; Sánchez et al., 2003; Palazuelos et al., 2006; Molina-Holgado et al., 2007). They can even promote neural progenitor proliferation via Akt/PI3K/mTOR1 (Palazuelos et al., 2012).

The physiological role of CB₂ receptors in the brain is not completely understood. It has been described that CB₂ receptors have an important role as neuroprotective agents by inhibiting inflammatory injury and promoting neural survival (Molina-Holgado et al., 2002; Fernández-Ruiz et al., 2007). During neurodegenerative disorders, like multiple sclerosis, Alzheimer or Huntington's disease, it can be up-regulated in microglial cells decreasing excitotoxicity or cell death and slowing disease

progression (Benito et al., 2003; Fernández-Ruiz et al., 2008; Sagredo et al., 2009; Palazuelos et al., 2009) while as potent anticancer agents, CB₂ receptors can inhibit glioma's or astrocytoma's growth by promoting apoptosis in tumoral cells as well as inhibiting tumor angiogenesis (Sánchez et al., 2001; Guzmán, 2003; Aguado et al., 2007; Fernández-Ruiz et al., 2007). Moreover, CB₂ receptors have been present in undifferentiated neural cells promoting neural progenitor proliferation *in vitro* and also *in vivo* during adult neurogenesis (Palazuelos et al., 2006; Goncalves et al., 2008; Palazuelos et al., 2012). CB₂ receptors have been detected in embryonic stem cells (Jiang et al., 2005). Nevertheless, its implication during brain development is still poorly understood. Herein, we took advantage of a *Xenopus laevis* embryo model of neural development to study the role of CB₂ receptor expression in this process by means of gain of function *in vivo* studies. We observed that CB₂ receptor expression induces relevant changes in signaling pathways, activating the Akt pathway whilst inhibiting the ERK 1/2 MAPK pathway. We also observed an up-regulation of *wnt8*, *pax2*, *pax3* or *fgf8* genes upon CB₂ receptor expression that may serve to maintain a proliferative state in stem cells of epibranchial placode in whose development these genes are involved. In addition, we observed that CB₂ but not CB₁ receptor expression induced impairment in development of certain cranial nerves. Our results indicate that CB₂ receptors have the potential to prevent neural differentiation of progenitor cells in an animal embryo model.

MATERIALS AND METHODS

cDNA constructs and cloning

The human cDNA for the CB₁ or CB₂ receptors cloned in pcDNA3.1 or cloned in EYFP expressing vector (EYFP-N1; enhanced yellow variant of GFP; Clontech, Heidelberg, Germany) to give CB₁-YFP and CB₂-YFP were amplified with their stop codons using sense and antisense primers harboring either unique *Bam*HI and *Eco*RI sites (for CB₁, CB₂ receptors) or *Eco*RI and *Xho*I (for CB₁YFP, CB₂YFP receptors). The fragments were then subcloned directionally SP6 to T7 into *Bam*HI and *Eco*RI sites (for CB₁, CB₂ receptors) or *Eco*RI and *Xho*I (for CB₁YFP, CB₂YFP receptors) of the

first polilinker of pCS2+ vector to give hCB₂pCS2+, CB₂-YFPpCS2+, hCB₁pCS2+, and CB₁-YFPpCS2+ plasmids.

Capped mRNAs

hCB₂pCS2+, CB₂-YFPpCS2+, hCB₁pCS2+, and CB₁-YFPpCS2+ plasmids were first linearized with *NotI* enzyme. Capped mRNAs were then synthesized *in vitro* from the template cDNAs using the SP6 mMMESSAGE mMACHINE Kit (Ambion, Life Technologies Corporation, Paisley, UK). After DNase digestion to remove cDNA template, transcripts were purified by adding 0.1 volume of ammonium acetate to avoid embryos gastrulation defects, extracted with 1 volume of phenol/chloroform, precipitated with 2 volumes of 100% ethanol, resuspended in water (500 ng/μl) and stored at -20°C. Concentration and length of transcripts were estimated by agarose gel electrophoresis as compared to known loading controls. As reporters, we used the *n-β-gal* containing the *nuclear-β-galactosidase* reporter inserted into the pCS2+ vector (Chitnis *et al.*, 1995) and the pCMTEGFP containing the *Enhanced Green Fluorescent Protein reporter* gene inserted into the pCS2+ vector.

Embryos handling, microinjection and manipulation

Xenopus laevis embryos were obtained by first injecting adult females with 800-1000 units of human chorionic gonadotropin (Gonasi HP 5000 U.I., Amsa) 12-14 hours prior to egg collection. Ovulated eggs were fertilized with testis homogenate and allowed to develop in Marc's Modified Ringer's (MMR) medium (1mM NaCl, 0.02mM KCl, 0.01mM MgSO₄, 0.02mM CaCl₂, 0.05mM HEPES (pH 7.8), 1μM EDTA) Jelly coats were removed by using the dejelling solution (3.2 mM dithiothreitol, 0.2M Tris buffer pH 8.8). Capped mRNAs in MMR medium supplemented with 3% Ficoll-400 were injected into one or two cells of blastomere of two-cell stage embryos using a Drummond "Nanoject" apparatus. Embryos were cultured in the same medium overnight at 18° C and subsequently transferred in new MMR medium and incubated at Room Temperature (R.T.) until the desired developmental stage. Embryos were staged according to Nieuwkoop and Faber (1967). When *n-β-gal* mRNA was used as a lineage tracer in microinjection experiments, *β-gal* staining was detected by fixing embryos in MEMFA medium (100 mM MOPS (pH 7.4) , 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3.7 % formaldehyde) for 30 min. at R.T., washing in PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 4 mM

Na₂HOP₄, 1.5 mM KH₂OP₄, pH 7.3) and then incubated in β -gal staining solution (5 mM K₃Fe(CN)₆, 52mM K₄Fe(CN)₆, 2 mM MgCl₂, 1 mg/ml X-gal or red-gal substrate in PBS) for 20-30 min at 37°C. Embryos were than fixed in MEMFA medium for 1 h at room temperature and then gradually dehydrated with ethanol to be processed by whole mount *in situ* hybridization.

Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization was performed with *XelrD* probe (Perron et al., 1999) at stage 32 wild type or injected embryos by using standard procedures as described in Harland (1991), except that BM purple (Roche, Basel, Switzerland) was used as a substrate for the alkaline phosphatase. After color development embryos were post-fixed in MEMFA medium and bleached to remove the pigment with bleaching solution (PBS supplemented with 2% H₂O₂, 5% formamide, 150 mM NaCl, 17 mM Na₃C₆H₅O₇) over a fluorescent light for about 1 h. Control experiments were performed with sense probes. For histological examination, whole-mount *in situ* hybridization processed embryos were embedded in a gelatin albumin solution according to the protocol described previously (Levin, 2004).

Whole mount immunohistochemistry

Whole-mount *in situ* immunohistochemistry was performed to detect CB₁-YFPpCS₂⁺ and CB₂-YFPpCS₂⁺ injected embryos at stage 32. Embryos were washed once with PBS containing 0.05 % tween (PBST) and 0.5% H₂O₂ and blocked with blocking solution (20% fetal bovine serum and 2% Blocking Reagent (Roche, Basel, Switzerland) in PBST) for 1h at R.T. Embryos were then incubated overnight at 4° with rabbit anti-GFP polyclonal antibody (1:2000 in PBS, Molecular Probes, Life Technologies Corporation, Paisley, UK). After incubation (1 h) with blocking solution, embryos were treated overnight at 4° with secondary antibody goat anti-rabbit IgG antibody-peroxidase (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), washed in PBST and visualized by alkaline phosphatase staining with DAB (Roche, Basel, Switzerland). After color development embryos were bleached as described above for *in situ* hybridization. For histological examination, embryos were embedded in a gelatin albumin solution according to the protocol described previously (Levin, 2004).

Total RNA and protein preparation from embryos

Extraction of total RNA and protein from frozen wild type or injected embryo heads (60 embryos for each experimental condition) at stage 32 was performed using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Samples were homogenized in TRI Reagent (1mL of Trizol per 100mg of tissue) and 200 μ l of chloroform per ml of Trizol was added to each sample. After 3 min incubation at R.T., samples were centrifuged 15 min at 4°C at 18,400 g. RNA was precipitated from the aqueous phase by addition of 500 μ l of isopropanol. After 10 min incubation at R.T. the supernatant was discarded by 10 min centrifugation at 13,500 g at 4°. The pellet was washed with 75% ethanol twice and solubilized in Nuclease-Free water (Promega, Madison, WI, USA) as described previously (Wilson and Melton, 1994). Proteins were obtained from the organic phase. First, DNA was precipitated by adding 300 μ l of 100% ethanol per 1 ml of TRI Reagent used initially and samples were centrifuged at 2,000 g for 5 min at 4°C. Proteins were precipitated from 300 μ l of the supernatant by adding 3 volumes of acetone. Samples were mixed by inversion, incubated for 10 min at R.T. and centrifuged at top speed in a microfuge for 10 min at 4°C. Supernatant was discarded and the protein was washed three times (10 min at R.T.) by pipetting in 500 μ l of 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol plus 2.5 % glycerol (1:1) and centrifuging at 8,000 g for 5 min at R.T. A final wash was performed in 1 ml of ethanol containing 2.5 % glycerol in the same conditions. Ethanol was decanted and proteins were solubilized in 400 μ l of SDS buffer (5mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v) β - mercaptoethanol, 12.5mM EDTA, 2% (w/v) bromophenol blue) for Western blot analysis.

RT-PCR assays

After DNase I (Promega) treatment, total RNA was reverse-transcribed to cDNA by random priming using High capacity cDNA reverse transcription kits (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). 100 ng per sample of the resulting single-stranded cDNA was used to perform real time PCR amplification with Power SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Relative expression of each gene for each sample condition was quantified using ornithine decarboxylase (ODC) as reference gene. RT-PCR primers used were designed with Primer-BLAST (NCBI, Bethesda MD, USA) and appear in Table 1. RNA without

reverse transcriptions did not yield any amplicons, indicating that there was no genomic DNA contamination.

ERK 1/2 and Akt/PKB phosphorylation assays

Protein samples were separated by electrophoresis on a denaturing 7.5% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF-FL membrane. Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) was then added and membrane was rocked for 90 min. The membrane was then incubated (overnight) with a mixture of a rabbit anti-phospho-Ser473 Akt antibody (1:2500, Signalway Antibody) to test the Akt phosphorylation or mouse anti-phospho-ERK1/2 antibody (1:2500, Sigma) to test ERK 1/2 phosphorylation. As a control of the amount of protein loaded, rabbit anti-ERK1/2 antibody that recognizes both, phosphorylated and non-phosphorylated ERK1/2 (1:40000, Sigma) was used. After washing the membrane four times with PBST (0,1%, 5 min), bands were visualized by the addition of IRDye 680 anti-rabbit antibody (1:10000, Sigma) or IRDye 800 anti-mouse antibody (1:10000, Sigma) or a mixture of both for 1h and scanned by the Odyssey infrared scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA). Bands densities were quantified using the scanner software, exported to Excel (Microsoft, Redmond, WA, U.S.A). The level of phosphorylated proteins was normalized for differences in loading using the total ERK 1/2 protein band intensities.

RESULTS

Over expression of human cannabinoid CB₂ but not CB₁ receptors in *Xenopus* embryos leads to impairment of cranial nerve development.

Although CB₁ receptors seem to be involved in neurogenesis, neural proliferation, axonal navigation and migration (Wilson and Nicoll, 2002; Aguado et al., 2005, 200; Harkany et al., 2007; Trazzi et al., 2010) and CB₂ receptors have relevant roles in neural progenitor proliferation and survival (Palazuelos et al., 2006; Molina-Holgado et al., 2007; Fernández-Ruiz et al., 2007), the role of CB₂ receptors in the neural development *in vivo* has not been studied. Here we have used a *Xenopus laevis* embryo model of neural development to study the potential role of CB₂ receptors in this process by means of *in vivo* gain of function studies. For that, human CB₁ and CB₂

receptors were subcloned onto the pCS2+ vector. Both hCB₁pCS2+ and hCB₂pCS2+ constructs were then transcribed in vitro to the corresponding capped mRNA. Embryos were injected into one cell of the two cells stage with 2 µg hCB₁pCS2+ or hCB₂pCS2+ mRNA or co-injected with both, together with mRNA 300ng of nuclear-β-galactosidase mRNA, used as a tracer of the injected side, and then analyzed until 42 stage for morphological phenotype comparison between injected and non injected side. None of the injected sides have shown any visible morphological changes. Then, we decided to inject or co-inject 2µg mRNA corresponding to hCB₁pCS2+ or hCB₂pCS2+ and the corresponding nuclear-β-galactosidase mRNA and look for changes in the developing neural tube and cranial ganglia. Since *Elav/HU* genes are good neural tube markers for neuronal maintenance and differentiation in the developing nervous system of *Xenopus laevis* (Perron et al., 1999; Nassar, 2011), we decided to use one of these genes, *elrD*, as a post mitotic marker. After mRNA injection, embryos were kept growing normally until stage 32, then we performed *in situ* hybridization whole mount assays as described in Material and Methods with a *XelrD* riboprobe and analyzed visual changes in the expression pattern among injected (red punctate nuclear-β-galactosidase stained side in Figure 1) and non injected sides. As it is shown in Figure 1, no changes were seen in the stained neural tube at the injected side (Figure 1B, D and F) compared with the non injected side (Figure 1A, C and E) in all of the injected embryos, but, surprisingly, 32% (Figure 1G) of the total hCB₂pCS2+ mRNA injected embryos showed abnormalities in cranial nerve formation in the injected side (Figure 1B compared to Figure 1A), with slight impairment of trigeminal and maxillomandibular nerves (V and VII respectively, Figure 1A) and strong reduction or a complete loss of the epibranchial ones, i.e., glossopharyngeal and vagal (IX and X respectively, Figure 1A). In contrast, only 5% (Figure 1G) of the total hCB₁pCS2+ mRNA injected embryos presented the same described phenotype (Figure 1D compared to Figure 1C). These results indicate that CB₂ receptor overexpression was able to impair the cranial nerve development while the CB₁ receptor did not. Nevertheless, when embryos were co-injected with both mRNAs at the same time, 55% (Figure 1G) of total embryos were found to show the cranial nerves impairment phenotype (Figure 1F compared to Figure 1E). It seems that CB₁ receptor expression enhances the effect exerted by CB₂ receptors. As a control, we verify that the human CB₁ and CB₂ receptors were both correctly translated within the embryos. To this purpose we generated new plasmidic constructs in which the sequence of hCB₁ or hCB₂ receptors were fused to *YFP* coding sequence into the pCS2+ vector.

The hCB₁-YFPpcS2⁺ or hCB₂-YFPpCS2⁺ plasmids were then transcribed *in vitro* and injected as described previously. The receptors expression in the embryos at stage 32 was confirmed by immunohistochemistry using an antibody against *YFP* protein. Similar expression of both receptors was obtained (Figure 2) and we also confirmed the maintenance of the percentage of embryos with cranial nerves impairment shown in Figure 1G by the *in situ* hybridization assays with *XelrD* riboprobe in the injected hCB₂-YFPpcS2⁺ and hCB₁-YFPpCS2⁺ embryos (data not shown).

To further analyze the effects of CB₂ receptor overexpression on the cranial nerve development, we tested the effect of CB₂ receptor agonist in this process. Wild type embryos or embryos injected as above described with hCB₂pCs2⁺ mRNA were treated with the specific CB₂ receptor agonist JWH133 (10 μM) by the agonist addition in the growing media at stage 2 (24 h treatment) or 25 (90 min treatment) until stage 32 of development. At the end of stage 32 *in situ* hybridization assays with *XelrD* riboprobe were performed. The treatment with JWH133 did not affect the cranial nerve development in wild type embryos (Figure 3). In contrast, an increase in the percentage of embryos with cranial nerves impaired phenotype in the injected side respect to the injected but non-treated embryos was observed after JWH133 treatment from stage 25 and more pronounced from stage 2 (Figure 3), indicating that agonist stimulation of CB₂ receptors are mediating the impairment of cranial nerves development.

Cannabinoid CB₂ receptors increased Akt phosphorylation and decreased ERK 1/2 phosphorylation in *Xenopus* embryos

In order to investigate the signaling pathways triggered by CB₂ receptor overexpression and activation in *Xenopus laevis* embryo, we studied the Akt and ERK 1/2 phosphorylation that are known to be indicators for the spatial and temporal signaling activation in the vertebrate embryo (Dubrulle and Pourqui, 2004; Corson et al., 2003). Embryos were injected into the two cells of stage 2 blastomere with 2 μg hCB₂pCs2⁺ mRNA and subsequently treated or not with the specific CB₂ receptor agonist JWH133 (10 μM) by the agonist addition in the growing media in stage 2 (24 h treatment) or 25 (90 min treatment) until stage 32 of development. At the end of stage 32, embryo heads were obtained and total protein was extracted as indicated in Materials and Methods and ERK 1/2 or Akt phosphorylation was determined by

western blot analysis (see Material and Methods). As it is shown in figure 4A, samples from CB₂ injected embryos show an increased phosphorylation of Akt compared with samples from wild type embryos and this increase was even higher in samples from embryos treated 24h with JWH133 (10 μM), indicating that both, the expression and activation of CB₂ receptors induce Akt phosphorylation. In contrast, ERK 1/2 phosphorylation was diminished in samples from CB₂ expressing embryos activated or not with JWH133 (Figure 4B). Thus, CB₂ overexpression and activation induced a differential signaling activating the Akt pathway whilst inhibiting the ERK 1/2 MAPK pathway. In a long term, mitogen activated protein kinase pathway induced by FGF is required to maintain early neuronal differentiation within the trigeminal placodes (Canning et al., 2008), our results suggest that CB₂ expression and activation might be altering the expression of genes involved in placodal and cranial nerve development.

Cannabinoid CB₂ receptor-mediated up-regulation of *fgf8*, *wnt8* and *pax2* gene expression in *Xenopus* embryos

In vertebrates, sensory neurons of cranial nerves are generated from focal embryonic ectoderm's thickenings, known as cranial placodes (D'Amico-Martel and Noden, 1983; Ayer-Le Lievre and Le Douarin, 1982). In order to further study the phenotype obtained after the CB₂ receptors overexpression, we investigated the expression level of genes known to be involved in placodal and cranial nerve development (Phillips et al., 2001; Hans et al., 2004, 2; Monsoro-Burq et al., 2005, 8; Hong et al., 2008, 8; Canning et al., 2008, 8; Padanad y Riley, 2011). Embryos were injected into the two cells stage with 2 μg hCB₂pCs₂+ mRNA and subsequently treated or not with the specific CB₂ receptor agonist JWH133 (10 μM) by the agonist addition in the growing media in stage 2 (24 h treatment) or 25 (90 min treatment) until stage 32 of development. At the end of stage 32 embryo heads were obtained and frozen and total cDNA from wild type embryos or both sides injected embryos without treatment or both sides injected embryos treated with 10 μM JWH133 for 90min or 24 h was obtained as described in Material and Methods. Real-time polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR) of *fgf8*, *fgf3*, *wnt1*, *wnt8*, *pax2a*, *pax8*, *pax3*, *pax6*, *sox2*, *sox3*, *six1* and *eyal* genes versus the house keeping gene ornithine decarboxylase (ODC) was performed using the primers described in Table 1. The expression of *fgf3*

(Figure 5 B), *wnt1* (Figure 5 D), *pax8* (Figure 5 F), *pax6* (Figure 5 H), *sox2* (Figure 5 I), *sox3* (Figure 5 J), *six1* (Figure 5 K) and *eya1* (Figure 5 L) genes did not change in embryos overexpressing CB₂ receptor activated or not with the agonist when compared to the wild type embryos. In contrast, the expression of CB₂ receptors significantly up-regulated the wnt/ β -catenin signaling pathway via up-regulation of *wnt8* (Figure 5 C) and *pax2* (Figure 5 E) genes even without JWH133 treatment. Interestingly, CB₂ injected embryos activated for 90 min with JWH133 showed an up-regulation of *fgf8* (Figure 5A) and *pax3* (Figure 5 G) expression with respect to the wild type embryos, that was increased after 24h of JWH133 treatment for *fgf8* expression. The up-regulation of *wnt8*, *pax2*, *pax3* or *fgf8* genes by CB₂ receptor expression with or without JWH133 activation correlates with alterations in cranial nerves development since all of these genes are involved in placodal and cranial nerve development (Phillips et al., 2001; Hans et al., 2004, 2; Monsoro-Burq et al., 2005, 8; Hong et al., 2008, 8; Canning et al., 2008, 8; Padanad and Riley, 2011)

DISCUSSION

Endogenous cannabinoids, by interacting with cannabinoid receptors, have been described to play a role in different CNS events. Particularly, CB₁ receptors, the most abundant GPCR in the CNS, have been involved in controlling neural homeostasis and survival (Molina-Holgado et al., 2002; Harkany et al., 2007; Marsicano et al., 2003) and also in neurogenesis, neural proliferation and fate specification in the brain (Wilson and Nicoll, 2002; Aguado et al., 2007; Berghuis et al., 2007; Trazzi et al., 2010). Neuronal CB₂ receptors have been less characterized, are less abundant in the CNS and, although it has been described to have relevant roles in neural progenitor proliferation (Palazuelos et al., 2006; Molina-Holgado et al., 2007; Goncalves et al., 2008) and neural survival (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2008), it is not known if they can play a role in neuronal development during embryogenesis. In this frame, three novel observations are here reported derived from gain of function experiments in a *Xenopus laevis* embryo model of neural development in vivo. First, overexpression of CB₂ and CB₁ receptors didn't alter the formation of primary neurons in neurula stage embryos but, interestingly, overexpression of CB₂, and not CB₁, led to impairment of maxillomandibular (VII), glossopharyngeal (IX) and vagal (X) cranial nerve development. Second, CB₂ receptor expression and activation induced a differential

signaling, activating the Akt pathway whilst inhibiting the ERK 1/2 MAPK pathway. Third, CB₂ receptor overexpression induced up-regulation of *fgf8*, *wnt8* and *pax2* gene expression that may lead to maintain a proliferative state along time in stem cells of epibranchial placode.

In vertebrates, sensory neurons from the head or cranial nerves are generated from cranial placodes, which include the adenohipophyseal, olfactory, lens, otic, lateral line, profundal/trigeminal, and epibranchial placodes (D'Amico-Martel and Noden, 1983; Ayer-Le Lievre and Le Douarin, 1982). According to Schlosser *et al* diagrams (Schlosser and Ahrens, 2004), posterior placodes in *Xenopus* embryos are break up giving rise to the individual placodes between early (21 stage) and late (33/34 stage) tail bud stage (Schlosser and Ahrens, 2004; Pieper *et al.*, 2011). Our results from *XelrD* hybridization in the non-injected embryos or wild type side of injected ones, pointed out that neurons from the posterior placodes are differentiated at stage 32 leading to the formation of the otic, and epibranchial epibranchial cranial nerves. Interestingly, our results show that CB₂ overexpression, although occurs all over the embryo in a non specific manner, leads to a specific and strong impairment of maxillomandibular (VII), glossopharyngeal (IX) and vagal (X) nerves that emerge mostly from the posterior placodal area and also a slight impairment in the trigeminal one (V). This cranial nerve impairment is also accompanied by changes in signaling pathways. CB₂ expression and activation induced a differential signaling activating the Akt pathway whilst inhibiting the ERK 1/2 MAPK pathway. Since mitogen activated protein kinase pathway induced by FGF is required to maintain early neuronal differentiation within the trigeminal placodes (Canning *et al.*, 2008), the inhibition of ERK 1/2 phosphorylation by overexpressed CB₂ receptors, activated by endogenous cannabinoids or activated by exogenous ligands, might be altering the expression of genes involved in placodal and cranial nerve development. Moreover, the morphological changes observed are detected in a spatiotemporal mode during posterior cranial nerve patterning between stage 21 and 32 in the developing embryo, indicating that CB₂ action may lead to very specific changes in a few genes that happen also in certain places and in a particular moment in the embryo development. Because in vertebrates all cranial placodes arise from a common panplacodal primordium, all of them have similar pathways controlling neurogenesis and morphogenetic changes (NIEUWKOOP, 1963; Nieuwkoop *et al.*, 1985; Torres and Giráldez, 1998; Schlosser, 2002; Baker and Bronner-Fraser, 2001;

Schlosser, 2010). However, except for a few genes like *eyal* and *six1*, that are expressed in all the placodes, it seems the molecular expression pattern for each placode development and specification can vary in a spatiotemporal manner. Schlosser et al, (Schlosser and Ahrens, 2004) were one of the first to describe molecular patterning and specification at *Xenopus* placode development in spatial temporal manner. From all the investigated genes, they saw that only *eyal*, *six1* and *six4* had uniform expression along every placode. It was proposed that this homogeneity may be involved in generic properties and promote pre-placodal formation. In our CB₂ overexpressing embryos, none of the genes that are involved in the generic placode formation (*eyal* and *six1*) changed their level of expression. This is consistent with the observed phenotype in which changes are restricted only to posterior cranial nerves. On the contrary, other genes, like pax homeobox genes, are expressed in different placodes during their induction and specification. In this way, *pax3* and *pax6* expression are candidates for trigeminal and profundal placode determination respectively, while *pax2* and *pax8* were confined to the posterior placodal area that include dorsolateral and epibranchial placodes (Schlosser and Ahrens, 2004). Importantly, the gene expression of transcription factors, required for placodal induction and specification, have to be finely regulated and turned off to allow the terminal differentiation of the posterior placodes (Torres and Giráldez, 1998). Thus, *pax2* and *pax8* genes were strongly induced to specifically break up the individual branches of nerves, but, once the placodes have acquired specification and fate, these transcription factors have to be downregulated. Of all the *pax* and *sox* genes studied here only *pax2* was found to be up-regulated, while the rest of *pax* genes showed no significant changes, except *pax3*, corresponding to the trigeminal placode, that seems to be significantly overexpressed when CB₂ is activated. Our results fit with the fact that *pax2* is specifically involved in the epibranchial induction and bifurcation in a later stage than its posterior placodes partner genes, and that down-regulation in rostral caudal sequence give rise to correct glossopharyngeal, maxillomandibular and vagal cranial nerves differentiation, a process that CB₂ receptors disrupted.

It has been described that *fgf8*, *fgf3* and *wnt8* are candidates as inductors of placodes specification in several animal models (Phillips et al., 2001; Sun et al., 2007; Nechiporuk et al., 2007; Canning et al., 2008; Padanad et al., 2012). We have seen that CB₂ expression can up-regulate *wnt8* gene expression suggesting a modulation of WNT

signaling while *fgf8* up-regulation requires long-term activation of exogenous CB₂ receptor with its specific agonist JWH133 suggesting that, in these conditions, FGF signaling can be modulated. *Fgf8* expression correlates with an Akt phosphorylation expression pattern in the mouse embryo (Dubrulle and Pourqui, 2004). It is tempting to speculate that in CB₂ overexpressing embryos the Akt phosphorylation increase could be due to a modulation of the *fgf8* signaling. However, since CB₂ receptor can also signal through Akt pathway (Sánchez et al., 2003) (Callén et al. 2012), we cannot discard the possibility that CB₂ receptor signaling can directly mediate this Akt phosphorylation pattern or both, CB₂ receptor and *fgf8* signaling, contribute together to increase Akt phosphorylation. *Fgf3* also was up-regulated when exogenous CB₂ receptor was activated and, although no significant effect was observed, we cannot exclude the involvement of this gene in our model. In some models of development, elevating WNT signaling can block epibranchial development (Ohyama et al., 2007) and FGF signaling gradient, along antero-posterior axis, has been proposed to keep cells in a proliferative state while differentiation is happening at time that FGF signaling decays and it has been proposed that differentiation would happen just when *fgf8* goes out (Dubrulle and Pourqui, 2004; Lahti et al., 2011, 8), a process that CB₂ receptor expression can disrupt. It must be pointed out that after CB₂ receptors expression and activation, an enhancement of WNT signaling via *wnt8* can cooperate with *fgf8* up-regulation in *pax2* induction what finally would lead to the observed phenotype. These two factors FGF and WNT signaling have been determined to be very important for regionalization and patterning mechanism in vertebrate development (Gamse and Sive, 2000; Schier, 2001; Kudoh et al., 2002; Stern et al., 2006). Although from our data we cannot predict which of these signals is first inducing or inhibiting the others, we can conclude that CB₂ receptor overexpression and activation, through Akt phosphorylation activation and ERK 1/2 phosphorylation inhibition and up-regulation of *fgf8* and *wnt8* expression may lead to maintain a sustained proliferative state in progenitor cells of epibranchial placode by up-regulating *pax2*. These results are the first in vivo evidence suggesting a role for CB₂ receptors in embryo development. These data constitute important and relevant evidence that CB₂ receptors can act by breaking the timing switch in cell fate and preventing neural differentiation of stem cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Jasmina Jiménez for technical help (University of Barcelona). This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia and Tecnología (SAF2010-18472 and SAF2008-03229-E within the frame of the Era-NET Neuron program,) and grant for collaborative projects PI2011/02-7 from Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). PJM is a Ramón y Cajal Fellow. LCH is a FPU Fellow (AP2007-00808)

References

- Aguado, T., A. Carracedo, B. Julien, G. Velasco, G. Milman, R. Mechoulam, L. Alvarez, M. Guzmán, and I. Galve-Roperh. 2007. Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J. Biol. Chem.* 282:6854–6862.
- Aguado, T., K. Monory, J. Palazuelos, N. Stella, B. Cravatt, B. Lutz, G. Marsicano, Z. Kokaia, M. Guzmán, and I. Galve-Roperh. 2005. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 19:1704–1706.
- Ashton, J.C., D. Friberg, C.L. Darlington, and P.F. Smith. 2006. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 396:113–116.
- Ayer-Le Lievre, C.S., and N.M. Le Douarin. 1982. The early development of cranial sensory ganglia and the potentialities of their component cells studied in quail-chick chimeras. *Dev. Biol.* 94:291–310.
- Baker, C.V., and M. Bronner-Fraser. 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev. Biol.* 232:1–61.
- Baker, D., G. Pryce, G. Giovannoni, and A.J. Thompson. 2003. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol.* 2:291–298.
- Benito, C., E. Núñez, R.M. Tolón, E.J. Carrier, A. Rábano, C.J. Hillard, and J. Romero. 2003. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J. Neurosci.* 23:11136–11141.
- Berghuis, P., A.M. Rajnicek, Y.M. Morozov, R.A. Ross, J. Mulder, G.M. Urbán, K. Monory, G. Marsicano, M. Matteoli, A. Canty, A.J. Irving, I. Katona, Y. Yanagawa, P. Rakic, B. Lutz, K. Mackie, and T. Harkany. 2007. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science.* 316:1212–1216.
- Brusco, A., P. Tagliaferro, T. Saez, and E.S. Onaivi. 2008a. Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse.* 62:944–949.
- Brusco, A., P.A. Tagliaferro, T. Saez, and E.S. Onaivi. 2008b. Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1139:450–457.
- Canning, C.A., L. Lee, S.X. Luo, A. Graham, and C.M. Jones. 2008. Neural tube derived Wnt signals cooperate with FGF signaling in the formation and differentiation of the trigeminal placodes. *Neural Dev.* 3:35.
- Corson, L.B., Y. Yamanaka, K.-M.V. Lai, and J. Rossant. 2003. Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development.* 130:4527–

4537.

- Cottone, E., C. Salio, M. Conrath, and M.F. Franzoni. 2003. *Xenopus laevis* CB1 cannabinoid receptor: molecular cloning and mRNA distribution in the central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 464:487–496.
- D’Amico-Martel, A., and D.M. Noden. 1983. Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *Am. J. Anat.* 166:445–468.
- Dubrulle, J., and O. Pourqui. 2004. *fgf8* mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature.* 427:419–422.
- Fernández-Ruiz, J., M.R. Pazos, M. García-Arencibia, O. Sagredo, and J.A. Ramos. 2008. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286:S91–96.
- Fernández-Ruiz, J., J. Romero, G. Velasco, R.M. Tolón, J.A. Ramos, and M. Guzmán. 2007. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.* 28:39–45.
- Galve-Roperh, I., J. Palazuelos, T. Aguado, and M. Guzmán. 2009. The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implications in psychiatric disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 259:371–382.
- Gamse, J., and H. Sive. 2000. Vertebrate anteroposterior patterning: the *Xenopus* neurectoderm as a paradigm. *Bioessays.* 22:976–986.
- Golech, S.A., R.M. McCarron, Y. Chen, J. Bembry, F. Lenz, R. Mechoulam, E. Shohami, and M. Spatz. 2004. Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 132:87–92.
- Gómez del Pulgar, T., G. Velasco, and M. Guzmán. 2000. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem. J.* 347:369–373.
- Goncalves, M.B., P. Suetterlin, P. Yip, F. Molina-Holgado, D.J. Walker, M.J. Oudin, M.P. Zentar, S. Pollard, R.J. Yáñez-Muñoz, G. Williams, F.S. Walsh, M.N. Pangalos, and P. Doherty. 2008. A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner. *Mol. Cell. Neurosci.* 38:526–536.
- Gong, J.-P., E.S. Onaivi, H. Ishiguro, Q.-R. Liu, P.A. Tagliaferro, A. Brusco, and G.R. Uhl. 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 1071:10–23.
- Guzmán, M. 2003. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer.* 3:745–755.
- Hans, S., D. Liu, and M. Westerfield. 2004. Pax8 and Pax2a function synergistically in otic specification, downstream of the Foxi1 and Dlx3b transcription factors. *Development.* 131:5091–5102.
- Harkany, T., M. Guzmán, I. Galve-Roperh, P. Berghuis, L.A. Devi, and K. Mackie. 2007. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol. Sci.* 28:83–92.
- Hong, C.-S., B.-Y. Park, and J.-P. Saint-Jeannet. 2008. Fgf8a induces neural crest indirectly through the activation of Wnt8 in the paraxial mesoderm. *Development.* 135:3903–3910.
- Jiang, W., Y. Zhang, L. Xiao, J. Van Cleemput, S.-P. Ji, G. Bai, and X. Zhang. 2005. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J. Clin. Invest.* 115:3104–

- Klein, T.W., C. Newton, K. Larsen, L. Lu, I. Perkins, L. Nong, and H. Friedman. 2003. The cannabinoid system and immune modulation. *J. Leukoc. Biol.* 74:486–496.
- Kudoh, T., S.W. Wilson, and I.B. Dawid. 2002. Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development.* 129:4335–4346.
- Lahti, L., J. Saarimäki-Vire, H. Rita, and J. Partanen. 2011. FGF signaling gradient maintains symmetrical proliferative divisions of midbrain neuronal progenitors. *Developmental Biology.* 349:270–282.
- Lanciego, J.L., P. Barroso-Chinea, A.J. Rico, L. Conte-Perales, L. Callén, E. Roda, V. Gómez-Bautista, I.P. López, C. Lluís, J.L. Labandeira-García, and R. Franco. 2011. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *J. Psychopharmacol. (Oxford).* 25:97–104.
- Levin, M. 2004. A novel immunohistochemical method for evaluation of antibody specificity and detection of labile targets in biological tissue. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 58:85–96.
- Little, J.P., E.B. Villanueva, and A. Klegeris. 2011. Therapeutic potential of cannabinoids in the treatment of neuroinflammation associated with Parkinson's disease. *Mini Rev Med Chem.* 11:582–590.
- Liu, Q. -R, C. -H Pan, A. Hishimoto, C. -Y Li, Z. -X Xi, A. Llorente-Berzal, M. -P Viveros, H. Ishiguro, T. Arinami, E.S. Onaivi, and G.R. Uhl. 2009. Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes, Brain and Behavior.* 8:519–530.
- Mackie, K. 2006. Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46:101–122.
- Mackie, K., and N. Stella. 2006. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J.* 8:E298–306.
- Maresz, K., E.J. Carrier, E.D. Ponomarev, C.J. Hillard, and B.N. Dittel. 2005. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J. Neurochem.* 95:437–445.
- Marsicano, G., S. Goodenough, K. Monory, H. Hermann, M. Eder, A. Cannich, S.C. Azad, M.G. Cascio, S.O. Gutiérrez, M. van der Stelt, M.L. López-Rodríguez, E. Casanova, G. Schütz, W. Zieglgänsberger, V. Di Marzo, C. Behl, and B. Lutz. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science.* 302:84–88.
- Di Marzo, V., M. Bifulco, and L. De Petrocellis. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 3:771–784.
- Molina-Holgado, E., J.M. Vela, A. Arévalo-Martín, G. Almazán, F. Molina-Holgado, J. Borrell, and C. Guaza. 2002. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J. Neurosci.* 22:9742–9753.
- Molina-Holgado, F., A. Rubio-Araiz, D. García-Ovejero, R.J. Williams, J.D. Moore, A. Arévalo-Martín, O. Gómez-Torres, and E. Molina-Holgado. 2007. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur. J. Neurosci.* 25:629–634.
- Monsoro-Burq, A.-H., E. Wang, and R. Harland. 2005. Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction. *Dev. Cell.* 8:167–178.
- Mulder, J., T. Aguado, E. Keimpema, K. Barabás, C.J. Ballester Rosado, L. Nguyen,

- K. Monory, G. Marsicano, V. Di Marzo, Y.L. Hurd, F. Guillemot, K. Mackie, B. Lutz, M. Guzmán, H.-C. Lu, I. Galve-Roperh, and T. Harkany. 2008. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:8760–8765.
- Nassar, F. 2011. Regulation and expression of *elrD1* and *elrD2* transcripts during early *Xenopus laevis* development. *The International Journal of Developmental Biology*. 55:127–132.
- Nechiporuk, A., T. Linbo, K.D. Poss, and D.W. Raible. 2007. Specification of epibranchial placodes in zebrafish. *Development*. 134:611–623.
- NIEUWKOOP, P.D. 1963. Pattern formation in artificially activated ectoderm (*Rana pipiens* and *Ambystoma punctatum*). *Dev. Biol.* 7:255–279.
- Nieuwkoop, P.D., A.G. Johnen, and B. Albers. 1985. The epigenetic nature of early chordate development: inductive interaction and competence. CUP Archive. 392 pp.
- Ohyama, T., A.K. Groves, and K. Martin. 2007. The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. *Int. J. Dev. Biol.* 51:463–472.
- Onaivi, E.S., H. Ishiguro, J. Gong, S. Patel, A. Perchuk, P.A. Meozzi, L. Myers, Z. Mora, P. Tagliaferro, E. Gardner, A. Brusco, B.E. Akinshola, Q. Liu, B. Hope, S. Iwasaki, T. Arinami, L. Teasentz, and G.R. Uhl. 2006. Discovery of the Presence and Functional Expression of Cannabinoid CB2 Receptors in Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1074:514–536.
- Padanad, M.S., N. Bhat, B. Guo, and B.B. Riley. 2012. Conditions that influence the response to Fgf during otic placode induction. *Developmental Biology*.
- Padanad, M.S., and B.B. Riley. 2011. Pax2/8 proteins coordinate sequential induction of otic and epibranchial placodes through differential regulation of *foxi1*, *sox3* and *fgf24*. *Dev. Biol.* 351:90–98.
- Palazuelos, J., T. Aguado, A. Egia, R. Mechoulam, M. Guzmán, and I. Galve-Roperh. 2006. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 20:2405–2407.
- Palazuelos, J., T. Aguado, M.R. Pazos, B. Julien, C. Carrasco, E. Resel, O. Sagredo, C. Benito, J. Romero, I. Azcoitia, J. Fernández-Ruiz, M. Guzmán, and I. Galve-Roperh. 2009. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain*. 132:3152–3164.
- Palazuelos, J., Z. Ortega, J. Díaz-Alonso, M. Guzmán, and I. Galve-Roperh. 2012. CB2 cannabinoid receptors promote neural progenitor cell proliferation via mTORC1 signaling. *J. Biol. Chem.* 287:1198–1209.
- Perron, M., M.P. Furrer, M. Wegnez, and L. Théodore. 1999. *Xenopus* *elav*-like genes are differentially expressed during neurogenesis. *Mech. Dev.* 84:139–142.
- Pertwee, R.G. 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* 74:129–180.
- Phillips, B.T., K. Bolding, and B.B. Riley. 2001. Zebrafish *fgf3* and *fgf8* encode redundant functions required for otic placode induction. *Dev. Biol.* 235:351–365.
- Pieper, M., G.W. Eagleson, W. Wosniok, and G. Schlosser. 2011. Origin and segregation of cranial placodes in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 360:257–275.
- Romero, J., I. Lastres-Becker, R. de Miguel, F. Berrendero, J.A. Ramos, and J. Fernández-Ruiz. 2002. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacol. Ther.* 95:137–152.
- Sagredo, O., S. González, I. Aroyo, M.R. Pazos, C. Benito, I. Lastres-Becker, J.P. Romero, R.M. Tolón, R. Mechoulam, E. Brouillet, J. Romero, and J. Fernández-

- Ruiz. 2009. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia*. 57:1154–1167.
- Sánchez, C., M.L. de Ceballos, T. Gomez del Pulgar, D. Rueda, C. Corbacho, G. Velasco, I. Galve-Roperh, J.W. Huffman, S. Ramón and Cajal, and M. Guzmán. 2001. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res*. 61:5784–5789.
- Sánchez, M.G., L. Ruiz-Llorente, A.M. Sánchez, and I. Díaz-Laviada. 2003. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell. Signal*. 15:851–859.
- Schier, A.F. 2001. Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 11:393–404.
- Schlosser, G. 2002. Development and evolution of lateral line placodes in amphibians I. Development. *Zoology (Jena)*. 105:119–146.
- Schlosser, G. 2010. Making senses development of vertebrate cranial placodes. *Int Rev Cell Mol Biol*. 283:129–234.
- Schlosser, G., and K. Ahrens. 2004. Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol*. 271:439–466.
- Van Sickle, M.D., M. Duncan, P.J. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N. Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, J.S. Davison, L.J. Marnett, V. Di Marzo, Q.J. Pittman, K.D. Patel, and K.A. Sharkey. 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 310:329–332.
- Stern, C.D., J. Charite, J. Deschamps, D. Duboule, A.J. Durston, M. Kmita, J.-F. Nicolas, I. Palmeirim, J.C. Smith, and L. Wolpert. 2006. Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems? *The International Journal of Developmental Biology*. 50:3–15.
- Sun, S.-K., C.T. Dee, V.B. Tripathi, A. Rengifo, C.S. Hirst, and P.J. Scotting. 2007. Epibranchial and otic placodes are induced by a common Fgf signal, but their subsequent development is independent. *Developmental Biology*. 303:675–686.
- Svíženská, I., P. Dubový, and A. Sulcová. 2008. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 90:501–511.
- Torres, M., and F. Giráldez. 1998. The development of the vertebrate inner ear. *Mech. Dev*. 71:5–21.
- Trazzi, S., M. Steger, V.M. Mitrugno, R. Bartsaghi, and E. Ciani. 2010. CB1 Cannabinoid Receptors Increase Neuronal Precursor Proliferation Through AKT/Glycogen Synthase Kinase-3 β /B-Catenin Signaling. *J. Biol. Chem*. 285:10098–10109.
- Wilson, R.I., and R.A. Nicoll. 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. 296:678–682.
- Zanettini, C., L.V. Panlilio, M. Alicki, S.R. Goldberg, J. Haller, and S. Yasar. 2011. Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front Behav Neurosci*. 5:57.
- Zurolo, E., A.M. Iyer, W.G.M. Spliet, P.C. Van Rijen, D. Troost, J.A. Gorter, and E. Aronica. 2010. CB1 and CB2 cannabinoid receptor expression during development and in epileptogenic developmental pathologies. *Neuroscience*. 170:28–41.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. CB₂ receptor overexpression leads to an impairment on *Xenopus* embryo cranial nerve development. (A-F) Whole mount *in situ* hybridization with *XelrD* riboprobe on *Xenopus* embryos at stage 32 showing neural tube (top blue staining in each embryo) and cranial nerves V (trigeminal), VII (maxillomandibular), IX (glossopharyngeal) and X (vagal). Embryos were injected into one cell of the two cells stage 2 blastomere with 2µg of capped mRNA corresponding to CB₂ (A, B), CB₁ (C, D) or both (E, F) and with 300ng of mRNA corresponding to nuclear-β-galactosidase used as a tracer of the injected side (red punctate β-galactosidase staining). The injected side (B, D, F) and non-injected control side of the same embryos (A, C, E) is shown. In (G) the percentage of embryos showing the impairment in cranial nerve phenotype for each condition is given, as well as the total number of counted embryos (N) in 3 to 4 different experiments. Results are means ± s.e.m.

Figure 2. CB₁R-YFP and CB₂R-YFP expression in *Xenopus* embryos at stage 32. Embryos were injected into one cell of the two cells stage with 2µg of capped mRNA corresponding to CB₂-YFP (A, B) or CB₁-YFP (C, D) receptor. At stage 32 of growing, the expression of the receptors at the injected side (A, D) was confirmed by immunohistochemistry using an antibody against *YFP* protein as described in Materials and Methods and compared with the lack of staining observed in not injected side (B, C).

Figure 3. Agonist stimulation of CB₂ receptors increased the percentage of embryos with cranial nerves impaired phenotype. Wild type embryos (WT) or embryos injected into one cell of the two cells stage with 2µg of capped mRNA corresponding to CB₂ receptors (CB₂) were treated or not with 10µM of JWH 133 from

stage 25 to stage 32 (JWH st25_32) or from stage 2 to stage 32 (JWH st2_32). The percentage of embryos showing the impairment in cranial nerve for each condition is given as well as the total number of counted embryos (N) in 3 to 4 different experiments. Results are means \pm s.e.m. Significant differences were analyzed by one way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (**p< 0.01, ***p< 0.001 compared to wild type embryos. #p< 0.05, compared to non treated CB₂ capped mRNA injected embryos).

Figure 4. CB₂ receptors increase Akt and decrease Erk 1/2 phosphorylation. Total protein samples from wild type embryos (WT) or CB₂ injected embryos not treated (INJ CB₂) or treated with 10 μ M JWH 133 during 90 min (INJ CB₂ JWH 90min) or 24 h (INJ CB₂ JWH 24h) were obtained as described in *Material and Methods* and Akt (A) or ERK 1/2 (B) phosphorylation was determined by western blot as described in *Material and Methods*. Results (means \pm s.e.m of 3 different experiments performed in triplicate) are in-folds over wild type embryos. Significant differences were analyzed by one way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (**p< 0.01, ***p< 0.001 compared to wild type embryos. ###p< 0.001 compared to non treated CB₂ injected embryos).

Figure 5. Role of CB₂ receptors on the expression of genes involved in cranial nerve development. Quantification of *fgf8* (A), *fgf3* (B), *wnt8* (C), *wnt1* (D), *pax2* (E), *pax8* (F), *pax3* (G), *pax6* (H), *sox2* (I), *sox3* (J), *six1*(K) and *eya1*(L) gene expression relative to the house keeping gene ornithine decarboxylase was performed with real time PCR as described in *Material and Methods* using the primers described in Table 1 and the cDNA from wild type (WT) or CB₂ capped mRNA injected (INJ CB₂) treated with 10 μ M JWH133 during 90 minutes (INJ CB₂ JWH 90min) or during 24 h (INJ CB₂ JWH 24h). Results (means \pm s.e.m of 3 different experiments) were given as in-

folds over wild type embryos. Significant differences were calculated by one way ANOVA followed by a Dunnett's multiple comparison post hoc test, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to wild type embryos).

Figure 1

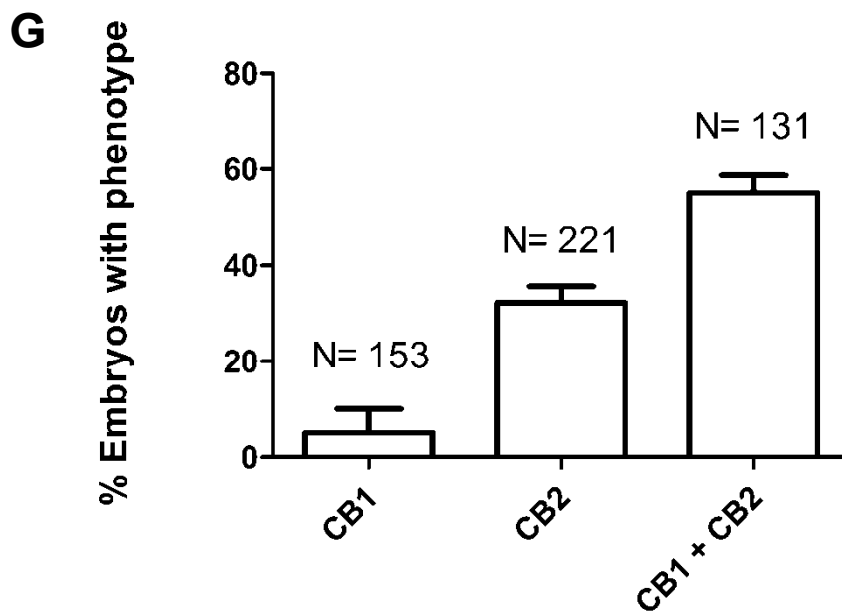
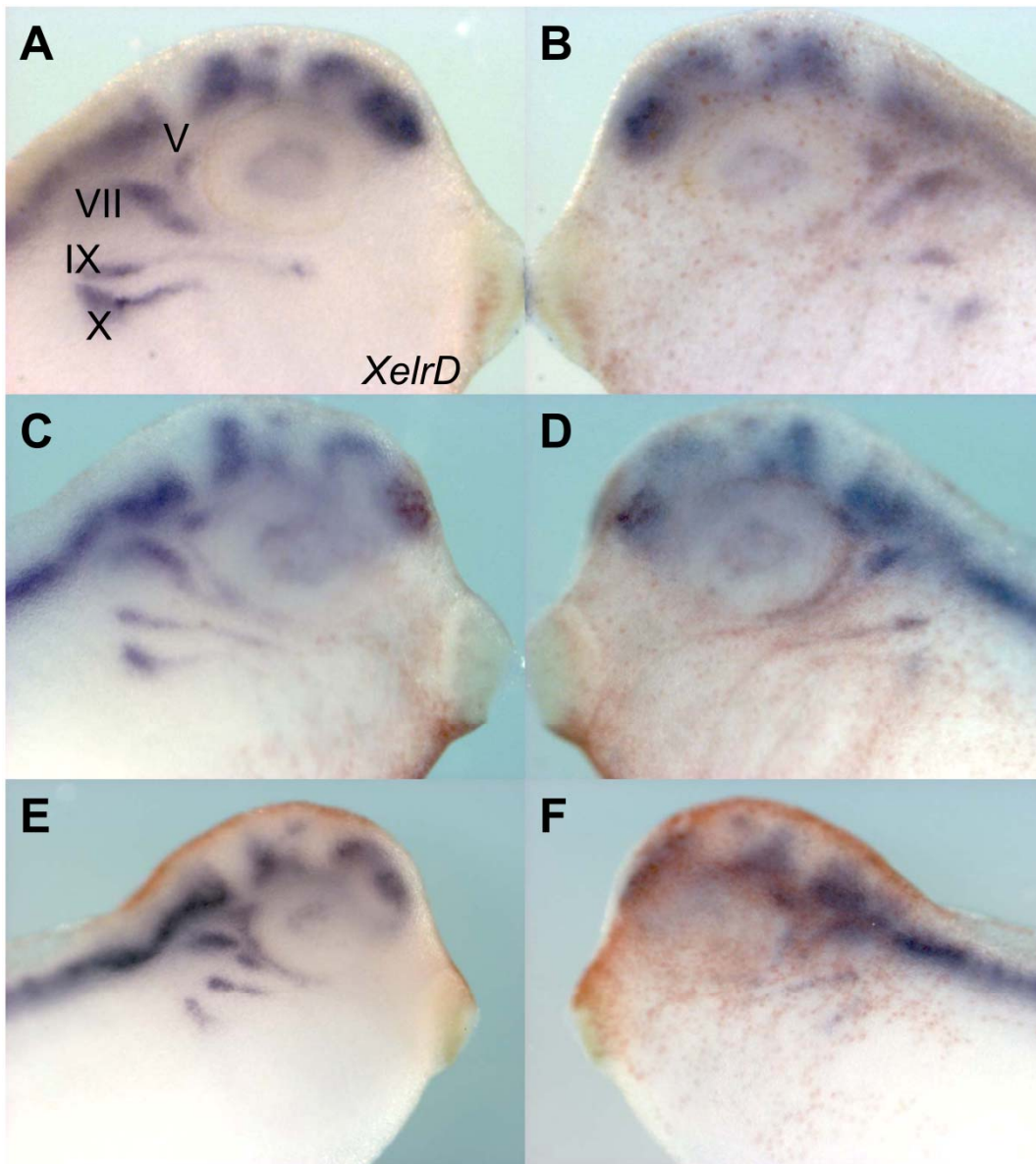


Figure 2

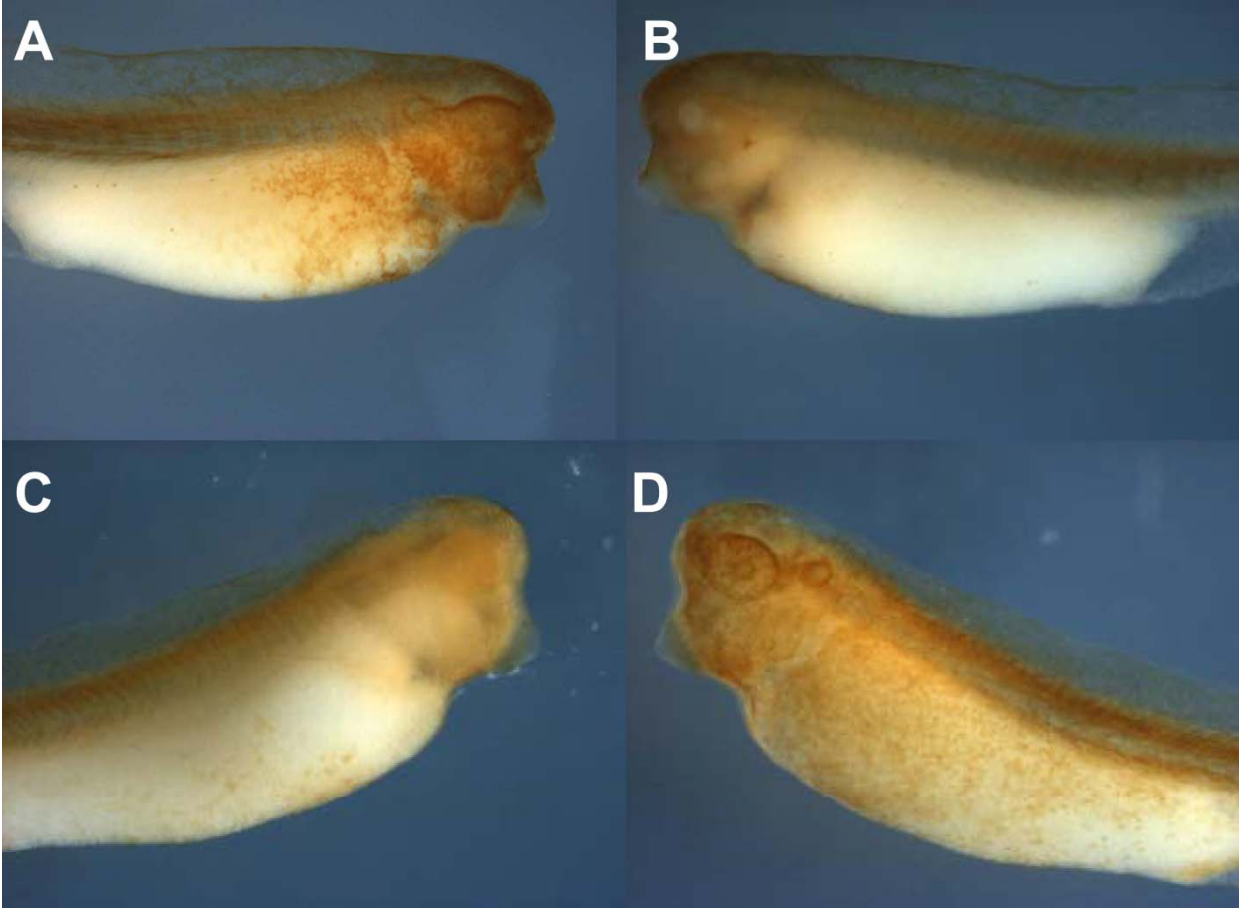


Figure 3

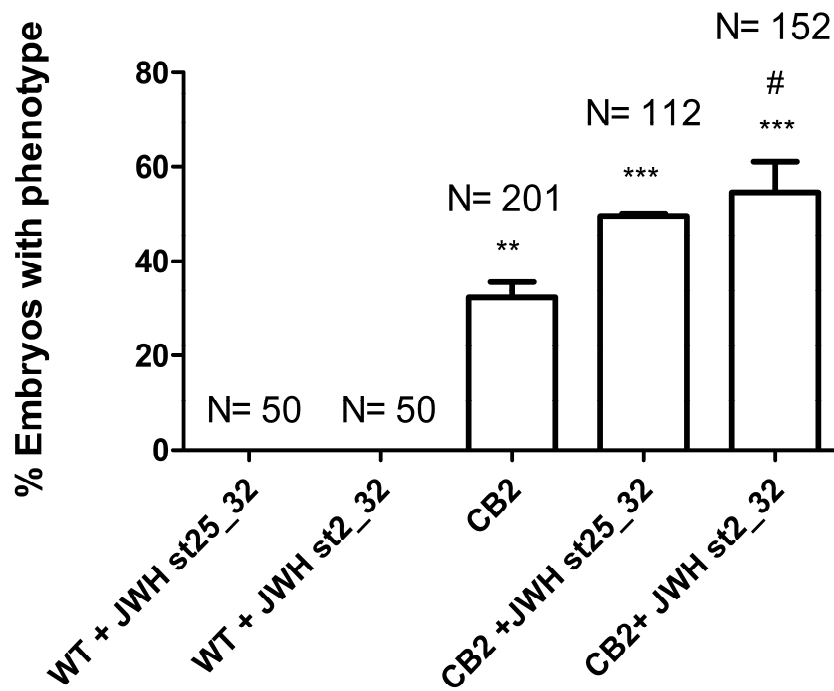
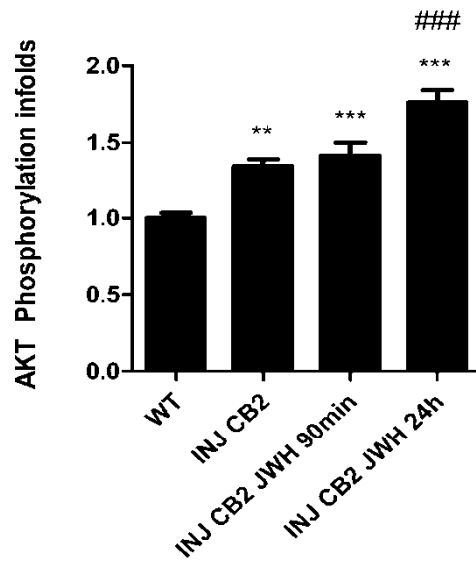
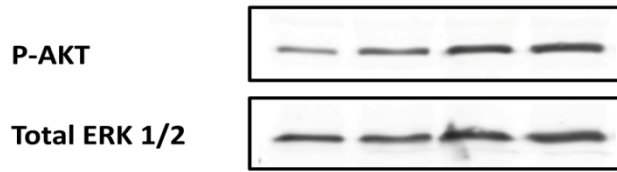


Figure 4

A



B

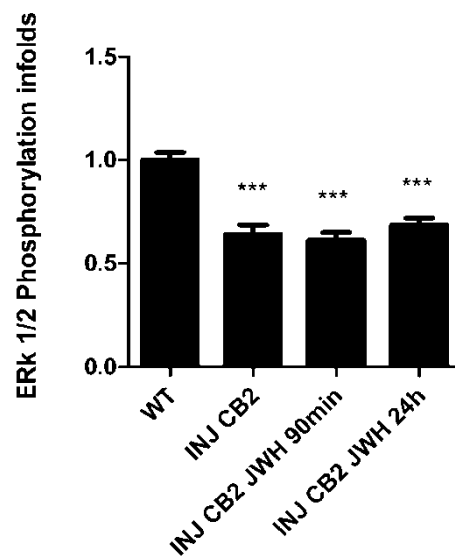
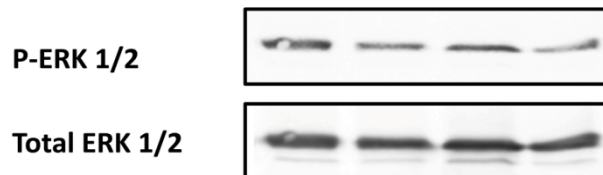
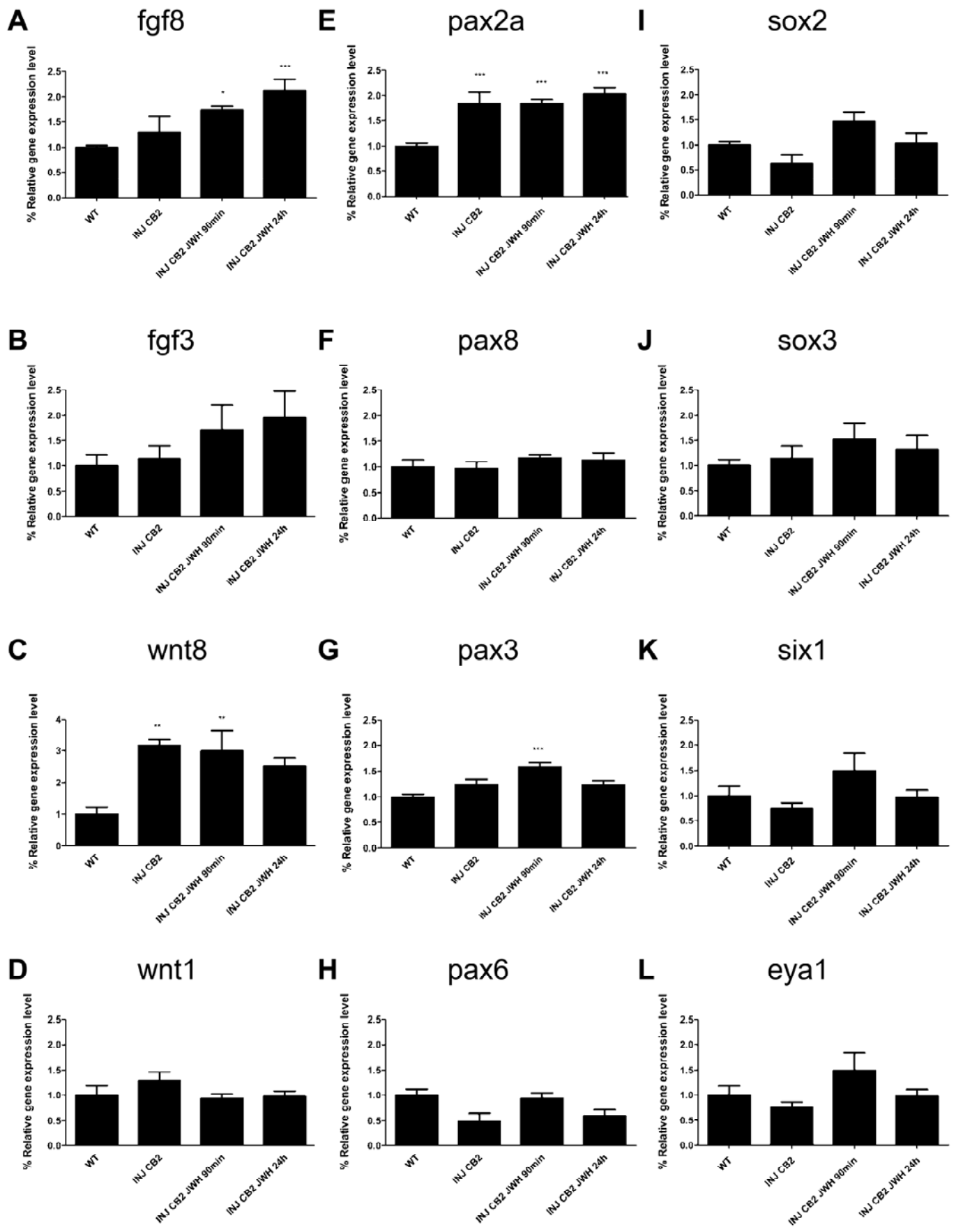
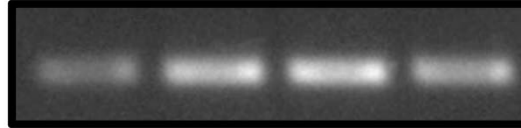


Figure 5

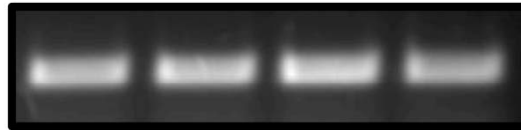


supplementary

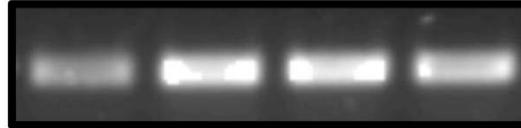
fgf8



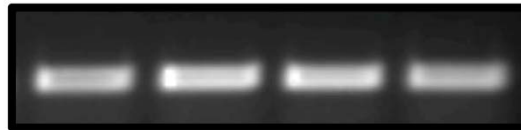
fgf3



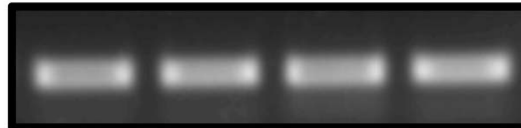
wnt8



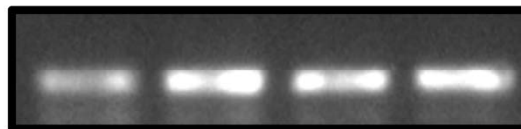
wnt1



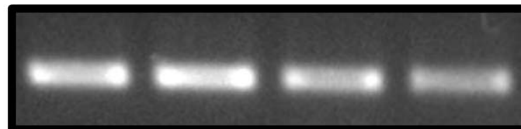
pax8



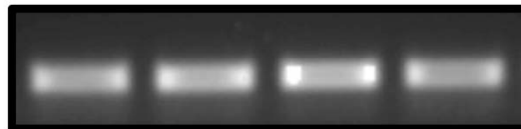
pax2a



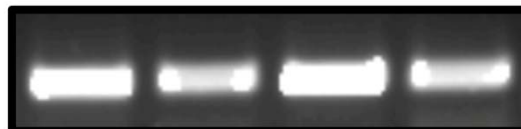
pax3



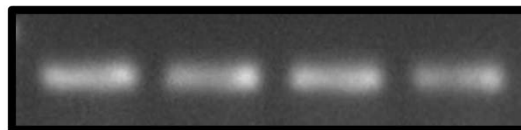
pax6



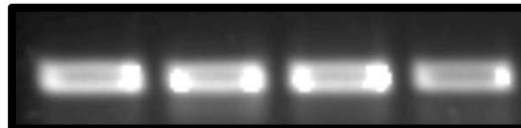
sox2



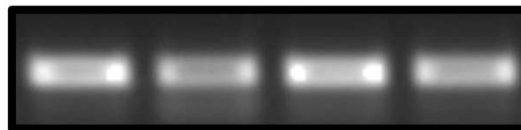
sox3



six1



eya1



ODC

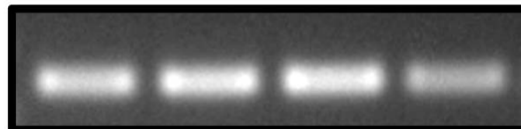


Table 1

Gene		Primer sequence (5'-3')	Reference
Mkp3	Fx	CGGCTGAAGGACGAGGGCTGC	Primer_blast (NCBI)
	Rx	AAGGACGGGTGGAGAGCTACTGCT	
Eya1	Fx	ATGACACCAAATGGCACAGA	Park and Saint_Jeannet 2008
	Rx	GGGAAAACCTGGTGTGCTTGT	
Fgf3	Fx	TGGAGGGGTTTACGAACATC	Domingo <i>et al.</i> , 2011
	Rx	CCCTTTGATGGCAACAATTC	
Fgf8	Fx	TTAAAGGTGCGGAGACTGGT	Domingo <i>et al.</i> , 2011
	Rx	TGTCTTCGACCCTTTCCTTG	
ODC	Fx	TGGGCTGGATCGTATCGTAGA	Fukui <i>et al.</i> , 2011
	Rx	CATTGAATGTCGAGGCTGCA	
Pax2a	Fx	GTGCTGCTCATGTCTTTCCA	Drews C., 2011
	Rx	TGGGTGGCTGTAAGGATTC	
Pax3	Fx	GCCATGTCCCGAGAACCAAC	Primer_blast (NCBI)
	Rx	CAAACAAGCCATTACCCACCAAC	
Pax6	Fx	TGCCCGACTCGACCAGACAGAAG	Bugner <i>et al.</i> , 2011
	Rx	GCGCAGCACTCGGTTTATTGATGA	
Pax8	Fx	ATGGAAAGCGCAAACCTTGAT	Park and Saint_Jeannet 2008
	Rx	CTAGAGGGTGGTGCCATAA	
Six1	Fx	GGGAGAAGCGGGAGTTGGCTG	Primer_blast (NCBI)
	Rx	CGACTTCCCTCCGTCTAGGGGTG	
Sox2	Fx	GAGGATGGACACTTATGCCAC	Danno <i>et al.</i> , 2008
	Rx	GGACATGCTGTAGGTAGGCCGA	
Sox3	Fx	AGACACTTACGCGCACATGA	Bentaya <i>et al.</i> , 2012
	Rx	TACCTGTGCTGGATCTGCTG	
Wnt1	Fx	GAATAACAGCGGCAAATGGT	Park and Saint_Jeannet 2008
	Rx	ACGTTTCTGCCGGCTAAGTA	
Wnt8	Fx	CTGGTGCTGCACAGTCAAAT	Park and Saint_Jeannet 2008
	Rx	CATTGAATGTCGAGGCTGCA	

3.3. Los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂ forman heterómeros funcionales en el cerebro.

Publicado en *Journal of Biological Chemistry* (2012)

Lucía Callén^{1,2}, Estefanía Moreno^{1,2}, Pedro Barroso-Chinea^{2,3}, David Moreno-Delgado^{1,2}, Antoni Cortés^{1,2}, Josefa Mallo^{1,2}, Vicent Casadó^{1,2}, José Luis Lanciego^{2,3}, Rafael Franco³, Carmen Lluís^{1,2}, Enric I. Canela^{1,2*}, and Peter J. McCormick^{1,2*}

¹Department Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona, España. ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas ³Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, España.

Estudiando el posible papel de los receptores de cannabinoides CB₂ en el cerebro, presentamos diversas evidencias de su interacción molecular y funcional con los receptores de cannabinoides CB₁. Mediante técnicas biofísicas y bioquímicas, hemos descubierto que los receptores CB₂ pueden formar heterómeros con los receptores CB₁ en células transfectadas neuronales y en la glándula pineal, núcleo accumbens y globo pálido del cerebro de rata. En los heterómeros CB₁-CB₂ expresados en un modelo celular neuronal, la co-activación con los agonistas de ambos receptores CB₁ y CB₂ dio lugar a una interacción negativa en la fosforilación de Akt y en el crecimiento de neuritas. Además, una característica específica del heterómero de receptores CB₁-CB₂ consiste en la capacidad de los antagonistas del receptor CB₁ de bloquear el efecto de los agonistas del receptor CB₂ y también al contrario, la capacidad de los antagonistas de CB₂ de bloquear el efecto de los agonistas de CB₁, mostrando un fenómeno de antagonismo cruzado bidireccional. En conjunto, estos datos clarifican el mecanismo por el cual los receptores CB₂ pueden modular negativamente la función del receptor CB₁.

Cannabinoid receptors CB₁ and CB₂ form functional heteromers in the brain[#]

Lucía Callén^{1,2}, Estefanía Moreno^{1,2}, Pedro Barroso-Chinea^{2,3}, David Moreno-Delgado^{1,2},
Antoni Cortés^{1,2}, Josefa Mallol^{1,2}, Vicent Casadó^{1,2}, José Luis Lanciego^{2,3}, Rafael Franco³,
Carmen Lluís^{1,2}, Enric I. Canela^{1,2*}, and Peter J. McCormick^{1,2*}

¹*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of
Barcelona, 08028 Barcelona, Spain*

²*Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas*

³*Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain*

*These authors contributed equally to this work

[#]Running Title: *CB₁ and CB₂ form heteromers*

To whom correspondence should be addressed: Peter J. McCormick, Department of
Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 643
Avenida Diagonal, planta -2, Barcelona 08028, Spain. Tel. 934039280; Fax. 934021559; email:
pmccormick AT ub.edu

Keywords: Cannabinoid receptors; heterodimers

CAPSULE

Background: While CB₁R, the most abundant neuronal receptors, and CB₂R are co-expressed in neurons the CB₁R-CB₂R relationship is unknown.

Results: CB₁R and CB₂R form heteromers in neuronal cells and in the brain.

Conclusion: Activation of either receptor leads to negative modulation of the partner receptor via heteromers.

Significance: These heteromers may explain previous conflicting results and serve as therapeutic targets.

SUMMARY

Exploring the role of cannabinoid CB₂ receptors in the brain, we present evidence of CB₂ receptor molecular and functional interaction with cannabinoid

CB₁ receptors. Using biophysical and biochemical approaches, we discovered that CB₂ receptors can form heteromers with CB₁ receptors in transfected neuronal cells and in rat brain pineal gland, nucleus accumbens and globus pallidus. Within CB₁-CB₂ receptor heteromers expressed in a neuronal cell model, agonist co-activation of CB₁ and CB₂ receptors resulted in a negative cross-talk in Akt phosphorylation and neurite outgrowth. Moreover, one specific characteristic of CB₁-CB₂ receptor heteromers consists of both, the ability of CB₁ antagonists to block the effect of CB₂ agonists and, conversely, the ability of CB₂ antagonists to block the effect of CB₁ agonists, showing a bidirectional cross-antagonism phenomenon. Taken together these data illuminate the mechanism by which CB₂ receptors can negatively modulate CB₁ receptor function.

INTRODUCTION

The endocannabinoid system (ECS) is known to have a broad impact on a variety of tissues. It has been shown to heavily influence cardiovascular and immune systems as well as control progenitor cell proliferation (1–3). More recently the ECS has emerged as a major player in the complex web of neuromodulators, constituting a new intercellular communication network mainly involved in the control of neurotransmitter release (4–7). By acting as retrograde messengers at various synapses, these endogenous arachidonic acid derivatives participate in controlling processes such as motor activity, memory and learning, appetite, emesis, nociception and some motivational responses (8–14). There are two known cannabinoid receptors, CB₁ and CB₂ with strong evidence of a third in the form of GPR55 and all have been considered as therapeutic targets for basal ganglia disorders (15, 16). CB₁ receptors mediate psychoactivity while CB₂-selective agonists lack psychoactivity but are implicated in the control of fundamental neural cell processes, such as proliferation and survival, and their pharmacological manipulation might be useful for both delaying the progression of neurodegenerative disorders and inhibiting the growth of glial tumors (17, 18). The CB₁ receptor is the most abundant receptor in the central nervous system and, besides its classical influence on mood and emotion, it has been demonstrated to play a role in the modulation of memory processing, and on metabolism (19). The ubiquitous expression pattern of CB₁ reflects the complexity and the variety of functions the ECS impacts in neuronal activity. CB₁ receptors are often localized presynaptically, where their stimulation usually inhibits neurotransmitter release (4, 20, 21). In the striatal spine module CB₁ are localized both pre and postsynaptically (22). Presynaptically, CB₁ receptors are localized in GABAergic terminals of interneurons or collaterals from medium spiny neurons (MSNs), and also in glutamatergic but not in dopaminergic terminals (23–27). Postsynaptically, CB₁ receptors are localized in the somatodendritic

area of MSN (23–25) and both enkephalinergic and dynorphinergic MSNs express CB₁ receptors (28). The related receptor, CB₂, traditionally was thought to be expressed in peripheral tissue where it can help control inflammation and various immunological responses (1), but recent reports have suggested it too can be found in the brain (albeit to a lower expression level than CB₁ receptors) (29) and to impact a variety of neuronal processes. Multiple studies have demonstrated CB₂ receptor expression in different non-neuronal (30–33) and neuronal populations (31, 34–38) where CB₂ receptors show a preferred post-synaptic localization (31, 35–37).

Both CB₁ and CB₂ receptors are members of the GPCR family and are Gi/Go-protein-coupled receptors (39). Agonist activation triggers inhibition of adenylyl cyclase and voltage-gated calcium channels, activation of potassium channels, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt signaling pathways (40, 41). Initially CB₁ and CB₂ receptors, like other GPCRs, were thought to have acted as single signaling receptors, but studies in the last decade have convincingly shown that certain GPCRs in a variety of different tissues can also form homodimers and even heteromers (42). For the cannabinoid receptors, heteromers have been shown to exist between CB₁ and the dopamine and adenosine receptors (43–47) as well as with angiotensin (AT₁) (48), opioid μ_1 (49) and orexin OX₁ receptors (50). However, to date no studies have examined the possible interactions between CB₁ and CB₂ receptors despite the fact that they have overlapping expression and that the two receptors have been shown to impact similar cellular processes. Here we report that CB₁ and CB₂ can form functional heteromers in transfected cells and in a variety of brain tissues. Heteromer formation leads to a negative cross-talk between receptor agonists and antagonists, suggesting an additional level of molecular regulation between the two receptors.

MATERIALS AND METHODS

Fusion proteins and expression vectors

The human cDNA for the CB₁R, CB₂R and dopamine D_{4.4} receptor cloned in pcDNA3.1 were amplified without their stop codons using sense and antisense primers harboring either unique *EcoRI* and *BamHI* sites (CB₁R, CB₂R) or *XhoI* and *EcoRI* (D_{4.4}R). The fragments were then subcloned to be in-frame with Rluc into the *EcoRI* and *BamHI* restriction site of an Rluc-expressing vector (pRluc-N1, PerkinElmer, Wellesley, MA), or with EYFP into the *EcoRI* and *BamHI* (CB₁R, CB₂R) or *XhoI* and *EcoRI* restriction site of an EYFP expressing vector (EYFP-N1; enhanced yellow variant of GFP; Clontech, Heidelberg, Germany), to give the plasmids that express CB₁R, CB₂R or D_{4.4} receptor fused to Rluc or YFP on the C-terminal end of the receptor (CB₂R-Rluc, CB₂R-YFP, CB₁R-YFP or D_{4.4}R-YFP). Expression of constructs was tested by confocal microscopy and the receptor functionality by ERK1/2 activation pathway (see Results).

Cell line cultures and transfection

Human embryonic kidney (HEK-293T), human neuroblastoma SH-SY5Y and neuroblastoma and glioma hybrid NG108-15 cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 100 U/ml penicillin/streptomycin and 10% (v/v) heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS). Other supplements were 2 mM L-glutamine for HEK-293T and SH-SY5Y cells, 1 mM sodium pyruvate for SH-SY5Y cells and 100 µM hypoxanthine, 0.02 µM aminopterin, 16 µM thymidine (HAT supplement) for NG108-15 cells. The human neuroblastoma SK-N-MC cells were grown in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 I. U./ml penicillin/streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 10% (v/v) heat inactivated FBS. All supplements were from Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, and were passaged when they were 80-90% confluent, i.e. approximately twice a week.

HEK-293T or SH-SY5Y cells were transiently transfected with the corresponding fusion protein cDNA by the ramified PEI

(PolyEthylenImine, Sigma, St. Louis, MO, USA) method. Cells were incubated (4 h) with the corresponding cDNA together with ramified PEI (5 ml of 10 mM PEI for each mg cDNA) and 150 mM NaCl in a serum-starved medium. After 4 hours, the medium was changed to a fresh complete culture medium. 72 hours after transfection, cells were washed twice in quick succession in Hanks' balanced salt solution HBSS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄ x12H₂O, 0.44 mM KH₂PO₄, 1.26 mM CaCl₂x2H₂O, 0.4 mM MgSO₄x7H₂O, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) supplemented with 0.1% glucose (w/v), detached by gently pipetting and resuspended in the same buffer. To control the cell number, sample protein concentration was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) using bovine serum albumin dilutions as standards.

Primary cultures of rat pinealocytes.

Male Sprague Dawley rats (3 month old, ≈350 g), receiving water and food *ad libitum*, were obtained from the animal facility of the Faculty of Biology (University of Barcelona). 4% Isoflurane (2-chloro-2-(difluoromethoxy)-1,1,1-trifluoro-ethane) anesthetized animals were killed by decapitation at 20:00h (after light period) and pineal glands were immediately dissected. All procedures were approved by the Catalan Ethical Committee for Animal Use (CEAA/DMAH 4049 and 5664). Pinealocytes were prepared from rat pineal glands as previously described by da Silveira Cruz-Machado (51). Briefly, pinealocytes were obtained by trypsinization (0.25%, 37°C, 15 min) followed by mechanical dispersion in the presence of fetal bovine serum. Cells were pelleted and resuspended in defined culture medium BGJb (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (heat-inactivated), 100 U/mL penicillin/streptomycin (pH 7.4). The total number of cells and fractional survival was estimated by Trypan blue exclusion. Cells (200,000 x well) were plated on polylysine coated 6-well chamber plates and maintained at 37°C, 5% CO₂ for 48 h prior to use.

Rat brain slices preparation

Rats were decapitated with a guillotine and the brains were rapidly removed and placed in ice-cold oxygenated (O₂/CO₂: 95%/5%) Krebs-HCO₃⁻ buffer (124 mM NaCl, 4mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 10 mM glucose and 26 mM NaHCO₃, pH 7.4). The brains were sliced at 4°C in a brain matrix (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, USA) into 0.5 mm coronal slices. Slices were kept at 4°C in Krebs-HCO₃⁻ buffer during the dissection of the nucleus accumbens and the globus pallidus. For signaling experiments, each slice was transferred into an incubation tube containing 1 ml of ice-cold Krebs-HCO₃⁻ buffer and the ERK 1/2 phosphorylation was determined as described below. For Proximity Ligation Assays, slices were fixed with 4 % paraformaldehyde solution for 1 h at room temperature with gentle agitation. The slices were then washed in TBS (50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.8), treated 5 min with 1% Na₂BH₄ dissolved in TBS, followed by successive TBS washes until all Na₂BH₄ was eliminated. Finally, the slices were cryopreserved in a 30% sucrose solution overnight at 4 °C and stored at -20 °C until sectioning. 15 µm-thick slices were cut on a freezing cryostat (Leica Jung CM-3000) and mounted on slide glass. Slices were thawed at 4°C, washed in TBS, and rocked with the blocking solution (Olink; Bioscience, Uppsala, Sweden) for 1 h at 37°C in a humidified atmosphere.

In Situ Proximity Ligation Assay (PLA)

Primary cultures of pinealocytes or SH-SY5Y cells transfected or not with 3 µg of cDNA corresponding to CB₂R-HA (Missouri S&T Resource Center, MO, USA), were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 20 mM glycine to quench the aldehyde groups. After permeabilization with PBS-glycine containing 0.05% Triton X-100 for 5 min, cells were incubated 1 h at room temperature with PBS containing 1% bovine serum albumin. Rat nucleus accumbens slices were obtained as described above. The receptor-receptor molecular interaction in these samples was detected using the Duolink II in situ PLA detection Kit (OLink; Bioscience,

Uppsala, Sweden). To detect heteromers in pinealocytes or in nucleus accumbens slices, the direct PLA linked primary antibodies were used. The rabbit anti CB₁ antibody (Thermo Scientific, Rockford, USA) was linked to a plus PLA probe and the rabbit anti CB₂ antibody (Cayman chemical, Ann Arbor, USA) was linked to a minus PLA probe following the instructions of the supplier. After 1 h incubation at 37°C with the blocking solution in a pre-heated humidity chamber, pinealocytes or slices were incubated overnight with these PLA probe-linked antibodies (1:1000) at 4°C. After washing with wash buffer at room temperature, samples were processed for ligation, amplification and detection as described by the manufacturer. As negative controls, pinealocytes or slices were incubated overnight with the plus PLA probe-linked rabbit anti CB₁ antibody and a goat anti D₄ primary antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) at 4°C followed by an incubation (2 h, 37°C) in a pre-heated humidity chamber with Duolink II minus PLA probe anti-goat diluted in the antibody diluent. To detect heteromers in SH-SY5Y cells, transfected or non-transfected (as negative controls) cells were incubated (1 h, 37°C) with the blocking solution in a pre-heated humidity chamber and then incubated overnight with the primary antibodies: rabbit anti CB₁ antibody (1:1000, Thermo Scientific, Rockford, USA) and mouse monoclonal anti HA-tag antibody (1:1000, Abcam, Cambridge, UK) in the antibody diluent medium. SH-SY5Y cells were washed with washing buffer at room temperature and incubated (2 h, 37°C) in a pre-heated humidity chamber with PLA probes detecting rabbit or mouse antibodies (Duolink II plus PLA probe anti-Rabbit and Duolink II minus PLA probe anti-Mouse) and processed as described above. Samples were mounted using the mounting medium with DAPI and observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

Immunostaining

After 72 h of transfection HEK-292T cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 20 mM glycine to

quench the aldehyde groups. After permeabilization with PBS-glycine containing 0.05% Triton X-100 for 5 min, cells were incubated with PBS containing 1% bovine serum albumin. After 1 h at room temperature, protein-Rluc was labeled with the primary mouse monoclonal anti-Rluc antibody (1:100, Chemicon, Billerica, MA) for 1 h, washed and stained with the secondary antibody Cy3 Donkey anti-mouse (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Protein-YFP was detected by its fluorescence properties. The samples were rinsed several times and mounted with a medium suitable for immunofluorescence (30% Mowiol, Calbiochem, Darmstadt, Germany). The samples were observed in a Leica SP2 confocal microscope.

RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from HEK-293T, SH-SY5Y, SK-N-MC or NG108-15 cells using QuickPrep Total RNA Extraction Kit (Amersham Biosciences) or from *Macaca fascicularis* spleen using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as described previously (38). Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed by random priming using M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant, following the protocol of Two-Step RT-PCR provided by Promega (Promega, Madison, WI, USA). The resulting single-stranded cDNA was used to perform PCR amplification for CB₁R, CB₂R and GAPDH as an internal control of PCR technique using *Taq* DNA Polymerase (Promega). Common primers to amplify human and rat cDNA were used. Primers to amplify CB₁R were: 5'-TGGGCAGCCTGTTCCCTCAC-3' (forward) and 5'-CATGCGGGCTTGGTC-3' (reverse). Primers to amplify CB₂R were 5'-CGTGGCTGTGCTCTATCTGA-3' (forward) and 5'-AGCCAGCTCAGCAGGTAGTC-3' (reverse). To amplify GAPDH the primers used were 5'-CATCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3' (forward) and 5'-GCCTGCTTACCACCTTCTTGATG-3' (reverse). RNA without reverse transcriptions

did not yield any amplicons, indicating that there was no genomic DNA contamination.

BRET assays

HEK-293T cells were transiently co-transfected with the indicated amounts of plasmid cDNAs corresponding to the indicated fusion proteins (see figure legends). To quantify receptor-fluorescence expression, cells (20 µg protein) were distributed in 96-well microplates (black plates with a transparent bottom; Porvair, King's Lynn, UK) and fluorescence was read in a FluoStar Optima Fluorimeter (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10 nm bandwidth excitation filter at 400 nm reading. Receptor-fluorescence expression was determined as fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing protein-Rluc alone. For BRET measurements, the equivalent of 20 µg of protein were distributed in 96-well microplates (Corning 3600, white plates; Sigma) and 5 µM coelenterazine H (Molecular Probes, Eugene, OR) was added. After 1 minute of adding coelenterazine H, the readings were collected using a Mithras LB 940 (Berthold, Bad Wildbad, Germany) that allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm (440-500 nm) and the long-wavelength filter at 530 nm (510-590 nm). To quantify receptor-Rluc expression luminescence readings were performed after 10 minutes of adding 5 µM coelenterazine H. Cells expressing BRET donors alone were used to determine background. The net BRET is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)]-Cf where Cf corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for the Rluc construct expressed alone in the same experiment. BRET curves were fitted by using a non-linear regression equation, assuming a single phase with GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA)

ERK 1/2 and Akt/PKB phosphorylation assays

Each globus pallidus slice, obtained as described above, was transferred into an incubation tube containing 1 ml of ice-cold

Krebs-HCO₃⁻ buffer and the temperature was raised to 23°C. After 30 min, the medium was replaced by 2 ml Krebs-HCO₃⁻ buffer (23°C) and was incubated under constant oxygenation (O₂/CO₂: 95%/5%) at 30°C for 4-5 h in an Eppendorf Thermomixer (5 Prime, Inc., Boulder, CO, USA). The medium was replaced by 200 µl of fresh Krebs-HCO₃⁻ buffer and incubated for 30 min before the addition of the desired concentrations of ligands. After the indicated incubation period, the solution was discarded and slices were frozen on dry ice and stored at -80°C until use. Transfected or non-transfected SH-SY5Y cells were cultured in serum-free medium for 16 h before the addition of any agent. Cells were treated or not with the indicated agonists for the indicated time. At the end of the incubation period, cells were rinsed with ice-cold phosphate-buffered saline. Cells or slices were lysed by the addition of 500 µL of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 45 mM β-glycerophosphate, 1% Triton X-100, 20 µM phenyl-arsine oxide, 0.4 mM NaVO₄ and protease inhibitor cocktail). The cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 g for 5 min at 4°C and the protein was quantified by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin dilutions as standard. Equivalent amounts of protein (10 µg) were separated by electrophoresis on a denaturing 7.5% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF-FL membrane. Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) was then added and the membrane was rocked for 90 min. The membrane was then incubated overnight with a mixture of a rabbit anti-phospho-Ser473 Akt antibody (1:2500, Signalway Antibody) to test the Akt phosphorylation or mouse anti-phospho-ERK1/2 antibody (1:2500, Sigma) to test ERK 1/2 phosphorylation. As a control of the amount of protein loaded, rabbit anti-ERK1/2 antibody that recognizes both, phosphorylated and non-phosphorylated ERK1/2 (1:40000, Sigma) was used. Bands were visualized by the addition of IRDye 680 (anti-rabbit) antibody (1:10000, Sigma) or IRDye 800 (anti-mouse) antibody (1:10000, Sigma) or a mixture of both for 1 h and scanned by the Odyssey infrared scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA). Bands

densities were quantified using the scanner software, exported to Excel (Microsoft, Redmond, WA, U.S.A). The level of phosphorylated proteins was normalized for differences in loading using the total ERK 1/2 protein band intensities.

Evaluation of neurite outgrowth

SH-SY5Y cells seeded in 10 mm coated glass coverslips were transfected or not with 3 µg of cDNA corresponding to CB₂R-YFP. 48 hours post-transfection cells were incubated for 24 hours in serum free-growing medium in absence or presence of 10 µM of retinoic acid, 100 nM of ACEA, or 50 nM of JWH133 (all from Tocris, Bristol, UK) alone or in combination. Cells were washed three times with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, washed with PBS containing 20 mM glycine, permeabilized for 5 min with PBS-glycine buffer containing 0.05% Triton-100 and blocked with PBS containing 1% BSA for 1 h at room temperature. Cells were labeled for 1 h with the primary mouse anti-MAP2 antibody (1:200, Calbiochem, San Diego, CA, USA). Subsequently, cells were washed and stained with the secondary antibody: Cy3-conjugated affinity-purified donkey anti-mouse IgG (1:200 dilution, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) and nuclear staining was performed with Hoechst (1:1000, 1 mg/ml, Sigma). Coverslips were rinsed for 5 min in PBS containing 1% BSA, 5 min in buffer PBS-glycine buffer and mounted with Mowiol mounting medium. Confocal microscope observations were made with a Leica TCS SP2 with a 40X objective. Cell bodies and neurites present in 8 to 12 randomly selected fields were measured in each experiment using Image J software. Cells were considered to be differentiated if they had at least one process longer than the cell body, which would be regarded as a neurite. The results are expressed in percentage of differentiated cells vs. the total cell number in non-transfected cells or vs. CB₂R-YFP expressing cells (detected by its own fluorescence) in transfected cells. At least three independent experiments were conducted for each treatment.

RESULTS

CB₂R form heteromers with CB₁R in transfected cells

A variety of GPCRs, including CB₁R, have been reported to be expressed as homomers and form heteromers with other GPCRs (43, 45, 49, 52) but it is not known whether CB₂R and CB₁R can form heteromers. To test this, the Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) technique was used. The BRET technique requires the use of fusion proteins consisting of CB₂R-Rluc, CB₁R-YFP and CB₂R-YFP. Prior to the BRET experiments we first confirmed that the fusion of Rluc or YFP to CB₂R or CB₁R did not modify receptor function as determined by ERK 1/2 phosphorylation assays (Fig. 1A). In addition, we confirmed that the subcellular localization of the fusion proteins was indeed in the cell membrane showing a high degree of colocalization when CB₂R-Rluc and CB₂R-YFP or CB₂R-Rluc and CB₁R-YFP were co-expressed (Fig. 1B). To test the ability of CB₁R and CB₂R to form heteromers, BRET measurements were performed in transiently co-transfected HEK-293T cells using a constant amount of cDNA corresponding to CB₂R-Rluc and increasing amounts of cDNA corresponding to CB₁R-YFP. As can be seen in Fig. 1C, the BRET signal increased as a hyperbolic function of the amount of the CB₁R-YFP expressed reaching an asymptote. From the saturation curve, a BRET_{max} of 33 ± 1 mBU and a BRET₅₀ of 8 ± 2 were calculated. The specificity of this interaction was demonstrated by comparing the BRET saturation curve with the low and linear BRET obtained for the negative control constituted by CB₁R-Rluc and D₄R-YFP (Fig. 1C). These results indicate that CB₁R and CB₂R form heteromers in co-transfected cells.

CB₁R and CB₂R form heteromers in SH-SY5Y neuroblastoma cells

Knowing that CB₁R and CB₂R form heteromers in HEK-293T transfected cells, we investigated whether they can form heteromers in a neuronal cell model. We first determined the endogenous receptor expression in different neuroblastoma cell

lines. As shown in Fig. 2A, all neuroblastoma cells tested expressed the mRNA corresponding to CB₁R but they did not express the mRNA corresponding to CB₂R. From these results, human SH-SY5Y neuroblastoma cells were selected. Non-transfected cells were used as CB₁R expressing neuroblastoma cells while SH-SY5Y cells transfected with HA tagged CB₂R were used as CB₁R and CB₂R expressing cells. The BRET technique is a powerful approach for looking at receptor interactions in co-transfected cells but BRET cannot be easily applied in native cells endogenously expressing one or both receptors. To solve this, other direct and indirect methods can be used. Here we sought to determine if the endogenous expressed CB₁R and transfected CB₂R could also form heteromers in a neuronal cell model. To do this we employed the Proximity Ligation Assay (PLA) that is used to detect protein interactions. This direct method requires that both receptors be close enough to allow the two different antibody-DNA probes to be able to ligate (<17nm) (53, 54). If the receptors are within sufficient proximity, a punctate fluorescent signal can be detected by confocal microscopy diagrammed in Figure 2B. For these experiments, two different and specific primary antibodies directed against each of the two receptors were used. One was the well known commercial mouse anti-HA antibody to detect the HA labeled CB₂R and the other was a rabbit anti CB₁R antibody. The specificity of this last antibody was tested in CB₁R-YFP or CB₂R-YFP transfected HEK-293T cells (Fig. 2C). Colocalization of fluorescence due to YFP with the anti-CB₁R antibody staining was detected in CB₁R-YFP transfected cells but not in CB₂R-YFP transfected cells and a lack of antibody-promoted staining was observed in non-transfected cells (cells that not show fluorescence) (Fig. 2C). Using these antibodies in PLA experiments, the CB₁R-CB₂R heteromers expression in SH-SY5Y cells was demonstrated by punctate fluorescent signal detected by confocal microscopy after excitation at 624 nm. This pattern was observed in CB₂R-expressing cells while no signal was detected in non-transfected cells used as a negative control (Fig. 2D).

CB₁R-CB₂R heteromers are expressed in the rat brain

To give more insight about the physiological relevance of CB₁R-CB₂R heteromers, we next investigated the expression of these heteromers in the rat brain taking advantage of the PLA approach used above. CB₁ is the most abundant GPCR in the brain (55). Although CB₂ expression is much lower, sometimes even undetectable, it is also known to be present in different brain areas, impacting endocannabinoid signaling, and colocalizing with CB₁R (32, 34, 36, 37, 56–59). Recently it has been shown that both CB₁R and CB₂R are co-expressed in the pineal gland, where they may be involved in the control of pineal physiology (57), and in the nucleus accumbens where CB₂R controls the cocaine intake (59). Despite evidence of their co-expression, nothing is known about CB₁R and CB₂R molecular interactions in the brain. Here we determined the expression of CB₁R-CB₂R heteromers in rat pinealocytes and nucleus accumbens by PLA. We used the rabbit anti CB₁R antibody described above and a rabbit anti CB₂R antibody that is specific for the CB₂R as previously demonstrated (57). Both antibodies were used directly linked to the PLA DNA probes as described in Materials and Methods. PLA experiments were performed with pinealocytes obtained from rat pineal glands extracted from a rat sacrificed at 20 h (after the light period) when the expression of CB₁R and CB₂R is more equilibrated (57) and with rat nucleus accumbens slices obtained as indicated in Materials and Methods. CB₁R-CB₂R heteromers in the primary cultures or in the slices were visualized as red spots around pinealocytes (Fig. 3A) or neurons (Fig. 3B) nucleus stained with Hoechst. Since CB₁R and dopamine D₄R do not form heteromers in BRET experiments (see Fig. 1C) we considered this pair as the negative control and performed the same assay using the PLA DNA probe-linked anti CB₁R antibody described above and a goat antibody against dopamine D₄R plus a goat secondary antibody linked to the corresponding PLA DNA probe (Fig. 3C and D). A quantification of cells containing one or more red spots versus total cells (blue nucleus) and the ratio *r* (number of red spots/ total cells), was

determined in 8 fields from three different experiments. 84% pinealocytes expressed CB₁R-CB₂R heteromers with an *r* = 1.48 in contrast with the 24% positive cells with an *r* = 0.3 detected in the negative control (Fig. 3E). Analogously 51% of nucleus accumbens cells (*r* = 2.11) expressed CB₁R-CB₂R heteromers in contrast with 3% cells (*r* = 0.04) detected for the negative control (Fig. 3F). These results indicate that CB₁R-CB₂R heteromers are expressed in rat pinealocytes and in rat nucleus accumbens.

Characterization of CB₁R-CB₂R heteromer signaling.

A common and often essential attribute of receptor heteromers is the ability to modify the downstream signaling versus the single constituent receptors. This type of receptor-receptor interaction has been observed for several receptor heteromers (60, 61). Since cannabinoid receptors have been previously described to be coupled to Akt/PKB protein activation in different cell types (40, 41, 62), we first investigated whether there were changes in Akt/PKB (Ser-473 Akt phosphorylation) signaling when heteromers were co-stimulated with both agonists or blocked with antagonists in SH-SY5Y neuronal cells. Non-transfected cells were used as CB₁R expressing neuroblastoma cells and cells transfected with CB₂R-YFP were used as CB₁R and CB₂R expressing cells. Treatment with 100 nM of CB₁R agonist ACEA induced Akt/PKB phosphorylation in both, non-transfected and transfected, cells (Fig. 4A and B) and the CB₂R agonist JWH 133-induced Akt/PKB phosphorylation only in transfected cells (Fig. 4A and B). Furthermore, JWH 133-induced Akt/PKB signaling was significantly diminished when cells expressing both receptors were co-stimulated with ACEA and JWH 133 (Fig. 4B and D). These results indicate that a negative cross-talk exists between CB₁R and CB₂R in Akt/PKB phosphorylation signaling. These results are not due to a change in the time in which the signaling peaks since differences were not observed in time-response curves when cells were activated with one or both agonists (Fig. 4C). It is important to point out that all ligands were first chosen based on their K_i

value ($K_1 = 1.4$ nM for ACEA ~1400-fold selective for CB₁R. $K_1=3.4$ nM for JWH133, ~200 fold selective for CB₂R) and following a dose-response curve for Akt activation where the lowest concentration that provided specific receptor signaling was chosen as the working concentration.

Looking at the effect of CB₁R and CB₂R antagonists, the 100nM ACEA-induced Akt/PKB phosphorylation was not significantly modified when non-transfected cells were pretreated with 500 nM AM630, a 165-fold selective CB₂R antagonist over CB₁R (63) (Fig. 4A), but it was completely counteracted when non transfected and transfected cells were pretreated with 200 nM AM251, a 306-fold selective CB₁R antagonist over CB₂R (64), as expected for specific CB₁ agonistic interaction (Fig. 4A and B). However, and interestingly, ACEA-induced Akt/PKB phosphorylation in cells expressing both receptors was also significantly prevented when pretreated with AM630 (Fig. 4B). Moreover, treatment with 50nM JWH 133, a 200-fold selective CB₂R agonist over CB₁R (65), did not induce Akt/PKB phosphorylation in non-transfected SH-SY5Y cells due to the lack of CB₂R expression in these cells (Fig. 4A), but, was able to induce Akt/PKB phosphorylation in cells expressing CB₁R and CB₂R (Fig. 4B). JWH 133-induced phosphorylation was blocked when cells expressing both cannabinoid receptors were pretreated with AM630, as expected for a specific CB₂R agonist, but was also prevented when cells expressing both receptors were pretreated with the CB₁R antagonist AM251. These results indicate that a bi-directional cross-antagonism exists between CB₁R and CB₂R in Akt/PKB phosphorylation signaling. We used this heteromer characteristic to further test for the expression of CB₁R-CB₂R heteromers in rat brain. We selected globus pallidus slices for these experiments since it has been described that globus pallidus expresses a high amount of CB₂R (38). The Akt/PKB and ERK 1/2 phosphorylation was determined in slices as indicated in Materials and Methods. CB₁R and CB₂R were poorly coupled to Akt/PKB phosphorylation in the Globus pallidus (results not shown) but the activation of both receptors increased ERK 1/2 phosphorylation (Fig. 5). The JWH 133

agonist-induced ERK 1/2 phosphorylation was blocked by AM630, as expected for a specific CB₂R antagonist, but this antagonist was also able to block the ERK 1/2 phosphorylation induced by the CB₁R agonist ACEA showing a cross-antagonism. These results strongly suggest that CB₁R-CB₂R heteromers may likely be expressed in the globus pallidus.

Functional characterization of CB₁R-CB₂R heteromers on neurite outgrowth

Since the endocannabinoid signaling pathway is involved in brain development and neural cell differentiation (66–68), and because activation of PI3K/Akt signaling is involved in neural differentiation of SH-SY5Y cells (69), we investigated the role of CB₁R-CB₂R heteromers on neuritogenesis in our SH-SY5Y neuronal cell model. Again, non-transfected cells were used as CB₁R expressing neuroblastoma cells and cells transfected with CB₂R-YFP were used as CB₁R and CB₂R expressing cells. The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y is a well-characterized model system to study neuronal differentiation *in vitro*. These cells develop long extensions and express several neuronal markers when treated with different agents including retinoic acid or phorbol esters (70). SH-SY5Y cells reduce their rate of growth and initialize differentiation, adopting a neuronal phenotype when exposed to 10 μ M retinoic acid (71, 72). This reagent was therefore used as a control treatment for neuritogenesis (Fig. 6). The effect of CB₁R and CB₂R agonist on neuritogenesis was analyzed by confocal microscopy, by quantifying neuritic processes in cells stained with an antibody against the microtubule associated protein MAP-2 (anti-MAP-2). Treatment with ACEA induced in both, non-transfected (Fig. 6A) and transfected (Fig. 6B) SH-SY5Y cells, the appearance of neurites in a moderate extent compared with the effect exerted by retinoic acid. Treatment with JWH 133, a selective CB₂R agonist, did not induce neuritogenesis in non-transfected SH-SY5Y cells as they do not express CB₂R (Fig. 6A), but induced neuritogenesis in cells expressing CB₁R and CB₂R (Fig. 6B). When cells expressing CB₁R and CB₂R were co-stimulated with JWH 133 and ACEA, the

JWH 133-induced neuritogenesis was diminished, (Fig. 6B and C), indicating a negative cross-talk between CB₁R and CB₂R in neuroblastoma cell differentiation, a phenomenon that is similar to the negative cross-talk observed at the Akt/PKB signaling.

Finally, we evaluated whether the bi-directional cross-antagonism observed between CB₁R and CB₂R in signaling can be also observed in the cannabinoid receptor-mediated neuritogenesis. As expected, the CB₁R antagonist, AM251 but not the CB₂R antagonist AM630, completely blocked the CB₁R agonist ACEA-induced neuritogenesis in non-transfected SH-SY5Y cells (Fig. 7A). Interestingly, both AM251 and AM630 were able to prevent the ACEA-induced or the CB₂R agonist JWH 133-induced neuritogenesis in CB₂R expressing SH-SY5Y cells (Fig. 7B). These results demonstrate the existence of a bi-directional cross-antagonism in the differentiation process that matches that observed in the Akt/PKB signaling described above. This indicates that the antagonist binding to one receptor in the CB₁R-CB₂R heteromer blocks the functionality of the entire heteromer.

DISCUSSION

The cannabinoid receptors CB₁ and CB₂ are becoming increasingly an important subject for investigation in a variety of neurological and immunological processes (1, 10–13). Although it has been described that both receptors can be co-expressed in the same brain areas (38, 57–59), the relationship between both receptors at the molecular level are not known. Among GPCRs, more and more evidence points to an important role of heteromer formation between GPCRs on receptor function modulation (42, 48, 60, 73). However, determination of the heteromer functional characteristics and, mainly, identification of heteromers in tissue is often a challenge. Here, we present evidence of CB₂R molecular and functional interaction with CB₁R receptors. Several conclusions can be drawn from the data. First, CB₁R and CB₂R can form heteromers in transfected cells and in a variety of brain tissues including pineal gland, nucleus accumbens

and globus pallidus. Second, one specific characteristic of CB₁R-CB₂R receptor heteromers is that of bidirectional cross-antagonism, ie. the ability of CB₁R antagonists to block the effect of CB₂R agonists and, conversely, the ability of CB₂R antagonists to block the effect of CB₁R agonists. Third, agonist co-activation of CB₁R-CB₂R heteromers results in a negative cross-talk in Akt phosphorylation and neurite outgrowth.

While it was known that CB₁R are highly expressed in the central nervous system, it was believed for a long time that CB₂R were restricted to the peripheral tissues (74). Recently, several studies have shown the expression of CB₂R in brain regions where CB₁R are also expressed (32, 34, 36, 37, 56–59) including the pineal gland (57), the nucleus accumbens (59) and the globus pallidus (38). Since the physiological role of the expression of two different receptors for the same endogenous ligands in the same brain regions is not obvious, we explored if both receptors are modulating each other and, for this reason, we first examined the possibility of direct receptor-receptor interaction by heteromerization. The identification of CB₁R-CB₂R heteromers was first performed via BRET, a biophysical technique, in co-transfected cells, and by immunofluorescence using the proximity ligation assays (PLA) in a neuronal cell model. The definition of a receptor heteromer is that the heteromer is a macromolecular complex composed of at least two functional receptor units with biochemical properties that are demonstrably different from those of its individual receptors (42). Thus, we focused on the determination of the functional characteristics of CB₁R-CB₂R heteromers expressed in neuroblastoma cells. Both cannabinoid receptors have been shown to signal through the MAP kinases and Akt/PKB pathways (41, 62); therefore we explored the implication of heteromer formation on these pathways. We first investigated whether there were changes in Akt/PKB (Ser-473 Akt phosphorylation) signaling when heteromers were both co-stimulated with agonists or blocked with antagonists. When neuroblastoma cells were co-stimulated with both receptor agonists, a negative cross-talk

was observed between CB₁R and CB₂R in Akt/PKB phosphorylation signaling. It has been described that activation of PI3K/ Akt signaling is involved in neural differentiation of SH-SY5Y cells (69); according to this, we observed that CB₁R and CB₂R agonist promoted neuritogenesis in our SH-SY5Y neuronal cell model and, interestingly, we also observed a negative cross-talk in neuritogenesis when cells were co-stimulated with both receptor agonists. Thus, both CB₁R and CB₂R might be negatively modulating each other in signaling pathways where endocannabinoids are involved, such as brain development and neural cell differentiation (66–68). Although these data, coupled with the BRET and PLA experiments, implicate heteromers in this receptor modulation, they could also be explained via simple signaling cross-talk rather than via physical interaction between receptors. Yet, the results obtained with the antagonists clearly show that CB₁R-CB₂R heteromers are the signaling units. Antagonists, by definition do not signal; thus, the fact that a CB₁R specific antagonist can block CB₂R signaling strongly argues against a cross-talk at the intracellular signaling level. A more likely explanation is that binding of the antagonist to CB₁R-CB₂R heteromers leads to a conformational change that reduces CB₂R induced Akt/PKB phosphorylation. We found this cross-antagonism to be bidirectional in Akt/PKB phosphorylation signaling and in neurite growth.

A question arising from our findings is: Are the CB₁R-CB₂R heteromers indeed expressed in the brain? We explored this possibility using different approaches. The cross-antagonism discussed above can be considered as a heteromer fingerprint and can be exploited to demonstrate the expression of CB₁R-CB₂R heteromers in globus pallidus, a brain region that expresses a high amount of CB₂R (38). CB₁R and CB₂R were poorly coupled to Akt/PKB phosphorylation in the rat globus pallidus but the activation of both receptors increased ERK 1/2 phosphorylation in rat globus pallidus slices. A clear cross-antagonism was observed for this signaling pathway indicating that CB₁R-CB₂R heteromers are expressed in the globus pallidus. A second question arising from our findings is: Can CB₁R-CB₂R heteromers

explain some of the reported results in the brain? Recently it has been described that both CB₁R and CB₂R are co-expressed in the pineal gland where they may be involved in the control of pineal physiology (57). In fact, CB₁R and CB₂R and the enzymes catalyzing endocannabinoid biosynthesis and degradation, were expressed in pinealocytes and immunosignals for the CB₂R did not vary under a 12 h light:12 h dark cycle while CB₁R immunoreaction was significantly reduced at the end of the light phase when the expression of both receptors is more balanced (57). We isolated pinealocytes from rat pineal glands extracted at the end of the light period and by taking advantage of the proximity ligation assays (PLA) we demonstrated the expression of CB₁R-CB₂R heteromers in pinealocytes. In the pineal gland, the rhythm in melatonin biosynthesis is under control of norepinephrine-mediated regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT), the penultimate enzyme of melatonin biosynthesis (75) and it has been described that phytocannabinoids like tetrahydrocannabinol reduce AANAT activity and attenuate melatonin biosynthesis in rat pineal glands (76). Thus, our results favor the hypothesis that through the negative cross-talk in CB₁R-CB₂R heteromers, CB₂R, mainly at the end of the light period, can negatively modulate the CB₁R-mediated tetrahydrocannabinol effect on AANAT activity and thus modulate melatonin synthesis. Another brain region where the CB₂R expression was reported is the nucleus accumbens where CB₂R may be directly involved in many of the neurochemical and motivational properties of cocaine that are responsible for addiction (59). In fact, CB₂R agonists directly infused into the nucleus accumbens decreased the cocaine intake, CB₂R regulated the psychomotor stimulant properties of cocaine and they found that CB₂R are endogenously activated by endocannabinoids in nucleus accumbens, where they control locomotor activity (59). Since CB₁R are also expressed in the striatum (24, 28) and is reported to be involved in the locomotor activity control (28), we determined the expression of CB₁R-CB₂R heteromers in rat nucleus accumbens slices by PLA. We found CB₁R-CB₂R heteromer expression in this brain region. Although the

CB₂R-mediated effects on locomotor activity are also seen in CB₁^{-/-} mice (59) our results provide a new perspective by which CB₁R and CB₂R might be modulating each other to control locomotion through CB₁R-CB₂R heteromers, using one partner as a “brake“ for the other partner's action when both are co-expressed in the same neuron. CB₁R are extremely abundant, but CB₂R, at least in neurons, are thought to be much less abundant. Altering the expression of CB₂R may provide a possible level of regulation of CB₁R function by changing the amount of CB₁R-CB₂R heteromers. Further studies will have to be performed to investigate this possibility.

Finally, our data may provide explanations for several previously controversial points concerning CB₁R and CB₂R. A confounding problem with the cannabinoid receptors has been the expression levels of the two receptors in the brain. Specifically there have been varying reports to the amount of CB₂R in the brain, whether those levels change in pathological settings as well as speculation on the role of neuronal CB₂R (18, 31, 34, 35, 37, 38, 77–82). Our results suggest that, even at low expression levels, CB₂R could have a significant effect on signaling from CB₁R by reducing the cellular response through CB₁R. This modulation could be up regulated upon injury or disease, supporting the thesis proposed recently by Onaivi and colleagues that CB₁R and CB₂R can work independently and/or cooperatively in differing neuronal populations (83). This interdependence in neurons expressing both receptors could be through heteromers. At the ligand level, low and high levels of cannabinoid receptor ligands have given different results (84, 85), which was interpreted as affecting different populations of neurons, or by the presence of another cannabinoid ligand mediated receptor such as TRPV1 or GPR55 in the same neurons, but an alternative explanation could also be the presence of receptor heteromers. Conflicting results have also been observed on the serotonin system at high and low doses

of the non-specific cannabinoid receptor agonist WIN55212,2. At low doses there was an increase in neuronal excitation that decreased at higher concentrations. The authors argued these effects must be through CB₁R as they could be blocked by the CB₁R specific antagonist, rimonabant. However, we show here that a CB₁R antagonist could also block CB₂R mediated signaling via receptor heteromers. It would be interesting to revisit these experiments using a CB₂R specific antagonist as well. Heteromers could also help explain seemingly opposite effects seen with the ligands 2-arachidonoylglycerol and anandamide, which have been reported to have seemingly opposite effects on striatal spiny neurons and sensory neurons of the dorsal root ganglion (reviewed by Vincenzo di Marzo (86)). Part of these effects could also be through differential signaling via CB₁R-CB₂R heteromers. More studies will be required to elucidate how these heteromers behave in different tissues at different concentrations of these two endogenous agonists. Another complication has been the discovery that multiple isoforms of CB₂R are expressed. Perhaps, the different isoforms of CB₂R can differentially modulate CB₁R and or vice versa depending on the tissue environment. Further studies may provide a clue as to how, at the mechanistic level, CB₂R is altering CB₁R signaling or vice versa and to help clarify if any differences in isoforms exist. Finally, a third family of the cannabinoids receptors has recently been proposed, GPR55 (87, 88); with which a functional interaction with CB₂R has also been described (89, 90). It will be interesting to further characterize its role, if any in the brain, and whether it too can form heteromers with the other members of the family. In conclusion, we report the presence of CB₁-CB₂ heteromers in a variety of brain regions. These heteromers may have a profound impact on CNS function in a variety of neurological and immunological systems and our data suggest that these heteromers must be taken into account when designing therapeutic approaches toward alterations involving the endocannabinoid system.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Jasmina Jiménez for technical help (University of Barcelona). This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía and Competitividad (SAF2010-18472, SAF2008-03229-E, SAF2008-03118-E within the framework of the Era-NET Neuron program) and a grant for collaborative projects PI2011/02-7 from the Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). PJM is a Ramón y Cajal Fellow. LCH is a FPU Fellow (AP2007-00808)

REFERENCES

1. Klein, T. W., Newton, C., Larsen, K., Lu, L., Perkins, I., Nong, L., and Friedman, H. (2003) *J. Leukoc. Biol.* **74**, 486–496
2. Aguado, T., Monory, K., Palazuelos, J., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzmán, M., and Galve-Roperh, I. (2005) *FASEB J.* **19**, 1704–1706
3. Mackie, K., and Stella, N. (2006) *AAPS J* **8**, E298–306
4. Piomelli, D. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 873–884
5. Katona, I., Urbán, G. M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K.-M., Piomelli, D., Mackie, K., and Freund, T. F. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 5628–5637
6. Freund, T. F., Katona, I., and Piomelli, D. (2003) *Physiol. Rev.* **83**, 1017–1066
7. Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S. C., Cascio, M. G., Gutiérrez, S. O., van der Stelt, M., López-Rodríguez, M. L., Casanova, E., Schütz, G., Zieglgänsberger, W., Di Marzo, V., Behl, C., and Lutz, B. (2003) *Science* **302**, 84–88
8. Ameri, A. (1999) *Prog. Neurobiol.* **58**, 315–348
9. Howlett, A. C. (2002) *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68-69**, 619–631
10. Venance, L., Maldonado, R., and Manzoni, O. (2004) *Med Sci (Paris)* **20**, 45–53
11. Schneider, U., Seifert, J., Karst, M., Schlimme, J., Cimander, K., and Müller-Vahl, K. R. (2005) *Nervenarzt* **76**, 1062, 1065–1066, 1068–1072 passim
12. Ashton, J. C. (2007) *Curr Opin Investig Drugs* **8**, 373–384
13. Cabral, G. A., Raborn, E. S., Griffin, L., Dennis, J., and Marciano-Cabral, F. (2008) *Br. J. Pharmacol.* **153**, 240–251
14. Katona, I., and Freund, T. F. (2008) *Nat. Med.* **14**, 923–930
15. Romero, J., Lastres-Becker, I., de Miguel, R., Berrendero, F., Ramos, J. A., and Fernández-Ruiz, J. (2002) *Pharmacol. Ther.* **95**, 137–152
16. Mackie, K. (2006) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46**, 101–122
17. Palazuelos, J., Aguado, T., Egia, A., Mechoulam, R., Guzmán, M., and Galve-Roperh, I. (2006) *FASEB J.* **20**, 2405–2407
18. Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Velasco, G., Tolón, R. M., Ramos, J. A., and Guzmán, M. (2007) *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 39–45
19. Zanettini, C., Panlilio, L. V., Alicki, M., Goldberg, S. R., Haller, J., and Yasar, S. (2011) *Front Behav Neurosci* **5**, 57
20. Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., and De Petrocellis, L. (1998) *Trends Neurosci.* **21**, 521–528
21. Maldonado, R., Valverde, O., and Berrendero, F. (2006) *Trends Neurosci.* **29**, 225–232
22. Ferré, S., Goldberg, S. R., Lluís, C., and Franco, R. (2009) *Neuropharmacology* **56 Suppl 1**, 226–234

23. Pickel, V. M., Chan, J., Kash, T. L., Rodríguez, J. J., and MacKie, K. (2004) *Neuroscience* **127**, 101–112
24. Pickel, V. M., Chan, J., Kern, C. S., and Mackie, K. (2006) *J. Comp. Neurol.* **495**, 299–313
25. Köfalvi, A., Rodrigues, R. J., Ledent, C., Mackie, K., Vizi, E. S., Cunha, R. A., and Sperlágh, B. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 2874–2884
26. Mátyás, F., Yanovsky, Y., Mackie, K., Kelsch, W., Misgeld, U., and Freund, T. F. (2006) *Neuroscience* **137**, 337–361
27. Uchigashima, M., Narushima, M., Fukaya, M., Katona, I., Kano, M., and Watanabe, M. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 3663–3676
28. Martín, A. B., Fernandez-Espejo, E., Ferrer, B., Gorriti, M. A., Bilbao, A., Navarro, M., Rodriguez de Fonseca, F., and Moratalla, R. (2008) *Neuropsychopharmacology* **33**, 1667–1679
29. Svízenská, I., Dubový, P., and Sulcová, A. (2008) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **90**, 501–511
30. Ashton, J. C., Friberg, D., Darlington, C. L., and Smith, P. F. (2006) *Neurosci. Lett.* **396**, 113–116
31. Brusco, A., Tagliaferro, P. A., Saez, T., and Onaivi, E. S. (2008) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1139**, 450–457
32. Golech, S. A., McCarron, R. M., Chen, Y., Bembry, J., Lenz, F., Mechoulam, R., Shohami, E., and Spatz, M. (2004) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **132**, 87–92
33. Maresz, K., Carrier, E. J., Ponomarev, E. D., Hillard, C. J., and Dittel, B. N. (2005) *J. Neurochem.* **95**, 437–445
34. Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D., and Sharkey, K. A. (2005) *Science* **310**, 329–332
35. Gong, J.-P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q.-R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., and Uhl, G. R. (2006) *Brain Res.* **1071**, 10–23
36. Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P. A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B. E., Liu, Q., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasent, L., and Uhl, G. R. (2006) *Annals of the New York Academy of Sciences* **1074**, 514–536
37. Brusco, A., Tagliaferro, P., Saez, T., and Onaivi, E. S. (2008) *Synapse* **62**, 944–949
38. Lanciego, J. L., Barroso-Chinea, P., Rico, A. J., Conte-Perales, L., Callén, L., Roda, E., Gómez-Bautista, V., López, I. P., Lluís, C., Labandeira-García, J. L., and Franco, R. (2011) *J. Psychopharmacol. (Oxford)* **25**, 97–104
39. Pertwee, R. G. (1997) *Pharmacol. Ther.* **74**, 129–180
40. Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., and Guzmán, M. (2000) *Biochem. J.* **347**, 369–373
41. Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martín, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J., and Guaza, C. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 9742–9753
42. Ferré, S., Baler, R., Bouvier, M., Caron, M. G., Devi, L. A., Durroux, T., Fuxe, K., George, S. R., Javitch, J. A., Lohse, M. J., Mackie, K., Milligan, G., Pflieger, K. D. G., Pin, J.-P., Volkow, N. D., Waldhoer, M., Woods, A. S., and Franco, R. (2009) *Nat. Chem. Biol.* **5**, 131–134
43. Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Müller, C., Woods, A. S., Hope, B. T., Ciruela, F., Casadó, V., Canela, E. I., Lluís, C.,

- Goldberg, S. R., Moratalla, R., Franco, R., and Ferré, S. (2007) *Neuropsychopharmacology* **32**, 2249–2259
44. Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., Cortés, A., Mallol, J., Fuxe, K., Canela, E. I., Lluís, C., and Franco, R. (2008) *Nat. Methods* **5**, 727–733
45. Navarro, G., Carriba, P., Gandía, J., Ciruela, F., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., and Franco, R. (2008) *ScientificWorldJournal* **8**, 1088–1097
46. Tebano, M. T., Martire, A., Chiodi, V., Pepponi, R., Ferrante, A., Domenici, M. R., Frank, C., Chen, J.-F., Ledent, C., and Popoli, P. (2009) *J. Neurochem.* **110**, 1921–1930
47. Akirav, I., and Fattore, L. (2011) *Front Behav Neurosci* **5**, 67
48. Rozenfeld, R., Gupta, A., Gagnidze, K., Lim, M. P., Gomes, I., Lee-Ramos, D., Nieto, N., and Devi, L. A. (2011) *EMBO J.* **30**, 2350–2363
49. Hojo, M., Sudo, Y., Ando, Y., Minami, K., Takada, M., Matsubara, T., Kanaide, M., Taniyama, K., Sumikawa, K., and Uezono, Y. (2008) *J. Pharmacol. Sci.* **108**, 308–319
50. Ward, R. J., Pediani, J. D., and Milligan, G. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 37414–37428
51. da Silveira Cruz-Machado, S., Carvalho-Sousa, C. E., Tamura, E. K., Pinato, L., Cecon, E., Fernandes, P. A. C. M., de Avellar, M. C. W., Ferreira, Z. S., and Markus, R. P. (2010) *J. Pineal Res.* **49**, 183–192
52. Mackie, K. (2005) *Life Sci.* **77**, 1667–1673
53. Söderberg, O., Leuchowius, K.-J., Gullberg, M., Jarvius, M., Weibrecht, I., Larsson, L.-G., and Landegren, U. (2008) *Methods* **45**, 227–232
54. Trifilieff, P., Rives, M.-L., Urizar, E., Piskorowski, R. A., Vishwasrao, H. D., Castrillon, J., Schmauss, C., Slättman, M., Gullberg, M., and Javitch, J. A. (2011) *BioTechniques* **51**, 111–118
55. Howlett, A. C., Bidaut-Russell, M., Devane, W. A., Melvin, L. S., Johnson, M. R., and Herkenham, M. (1990) *Trends Neurosci.* **13**, 420–423
56. Núñez, E., Benito, C., Pazos, M. R., Barbachano, A., Fajardo, O., González, S., Tolón, R. M., and Romero, J. (2004) *Synapse* **53**, 208–213
57. Koch, M., Habazettl, I., Dehghani, F., and Korf, H.-W. (2008) *J. Pineal Res.* **45**, 351–360
58. Suárez, J., Llorente, R., Romero-Zerbo, S. Y., Mateos, B., Bermúdez-Silva, F. J., de Fonseca, F. R., and Viveros, M.-P. (2009) *Hippocampus* **19**, 623–632
59. Xi, Z.-X., Peng, X.-Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.-Y., Liu, Q.-R., Yang, H.-J., Bi, G.-H., Li, J., and Gardner, E. L. (2011) *Nat. Neurosci.* **14**, 1160–1166
60. Moreno, E., Vaz, S. H., Cai, N.-S., Ferrada, C., Quiroz, C., Barodia, S. K., Kabbani, N., Canela, E. I., McCormick, P. J., Lluís, C., Franco, R., Ribeiro, J. A., Sebastião, A. M., and Ferré, S. (2011) *J. Neurosci.* **31**, 7412–7423
61. González, S., Rangel-Barajas, C., Peper, M., Lorenzo, R., Moreno, E., Ciruela, F., Borycz, J., Ortiz, J., Lluís, C., Franco, R., McCormick, P. J., Volkow, N. D., Rubinstein, M., Floran, B., and Ferré, S. (2011) *Mol. Psychiatry* [en línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21844870> (Accedido diciembre 17, 2011).
62. Sánchez, M. G., Ruiz-Llorente, L., Sánchez, A. M., and Díaz-Laviada, I. (2003) *Cell. Signal.* **15**, 851–859
63. Hosohata, Y., Quock, R. M., Hosohata, K., Makriyannis, A., Consroe, P., Roeske, W. R., and Yamamura, H. I. (1997) *European Journal of Pharmacology*

321, R1–R3

64. Pertwee, R. G. (2005) *Handb Exp Pharmacol*, 1–51
65. Huffman, J. W., Liddle, J., Yu, S., Aung, M. M., Abood, M. E., Wiley, J. L., and Martin, B. R. (1999) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**, 2905–2914
66. Fernández-Ruiz, J., Gómez, M., Hernández, M., de Miguel, R., and Ramos, J. A. (2004) *Neurotox Res* **6**, 389–401
67. Harkany, T., Guzmán, M., Galve-Roperh, I., Berghuis, P., Devi, L. A., and Mackie, K. (2007) *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 83–92
68. Mulder, J., Aguado, T., Keimpema, E., Barabás, K., Ballester Rosado, C. J., Nguyen, L., Monory, K., Marsicano, G., Di Marzo, V., Hurd, Y. L., Guillemot, F., Mackie, K., Lutz, B., Guzmán, M., Lu, H.-C., Galve-Roperh, I., and Harkany, T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 8760–8765
69. López-Carballo, G., Moreno, L., Masiá, S., Pérez, P., and Baretino, D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 25297–25304
70. Pålman, S., Hoehner, J. C., Nånberg, E., Hedborg, F., Fagerström, S., Gestblom, C., Johansson, I., Larsson, U., Lavenius, E., and Ortoft, E. (1995) *Eur. J. Cancer* **31A**, 453–458
71. Pålman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E., and Esscher, T. (1984) *Cell Differ.* **14**, 135–144
72. Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., and Comella, J. X. (2000) *J. Neurochem.* **75**, 991–1003
73. Fiorentini, C., Busi, C., Spano, P., and Missale, C. (2010) *Curr Opin Pharmacol* **10**, 87–92
74. Munro, S., Thomas, K. L., and Abu-Shaar, M. (1993) *Nature* **365**, 61–65
75. Klein, D. C. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 4233–4237
76. Koch, M., Dehghani, F., Habazettl, I., Schomerus, C., and Korf, H.-W. (2006) *J. Neurochem.* **98**, 267–278
77. Benito, C., Núñez, E., Tolón, R. M., Carrier, E. J., Rábano, A., Hillard, C. J., and Romero, J. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 11136–11141
78. Ehrhart, J., Obregon, D., Mori, T., Hou, H., Sun, N., Bai, Y., Klein, T., Fernandez, F., Tan, J., and Shytle, R. D. (2005) *J Neuroinflammation* **2**, 29
79. Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J.-P., Patel, S., Meozzi, P. A., Myers, L., Perchuk, A., Mora, Z., Tagliaferro, P. A., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B. E., Liu, Q.-R., Chirwa, S. S., Hope, B., Lujilde, J., Inada, T., Iwasaki, S., Macharia, D., Teasenfiz, L., Arinami, T., and Uhl, G. R. (2008) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1139**, 434–449
80. Sagredo, O., González, S., Aroyo, I., Pazos, M. R., Benito, C., Lastres-Becker, I., Romero, J. P., Tolón, R. M., Mechoulam, R., Brouillet, E., Romero, J., and Fernández-Ruiz, J. (2009) *Glia* **57**, 1154–1167
81. García-Gutiérrez, M. S., and Manzanares, J. (2011) *J. Psychopharmacol. (Oxford)* **25**, 111–120
82. Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gu, S., and Liu, Q.-R. (2011) *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)* [en línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21447538> (Accedido octubre 13, 2011).
83. Onaivi, E. S. (2011) *Curr Neuropharmacol* **9**, 205–208
84. Bambico, F. R., Katz, N., Debonnel, G., and Gobbi, G. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 11700–11711
85. Bellocchio, L., Lafenêtre, P., Cannich, A., Cota, D., Puente, N., Grandes, P., Chaouloff, F., Piazza, P. V., and Marsicano, G. (2010) *Nat. Neurosci.* **13**, 281–

283

86. Di Marzo, V. (2011) *Nat. Neurosci.* **14**, 9–15
87. Pertwee, R. G. (2007) *Br. J. Pharmacol.* **152**, 984–986
88. Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., and Greasley, P. J. (2007) *Br. J. Pharmacol.* **152**, 1092–1101
89. Balenga, N. A. B., Aflaki, E., Kargl, J., Platzer, W., Schröder, R., Blättermann, S., Kostenis, E., Brown, A. J., Heinemann, A., and Waldhoer, M. (2011) *Cell Res.* **21**, 1452–1469
90. Irving, A. (2011) *Cell Res.* **21**, 1391–1392

FIGURE LEGENDS

Figure 1. CB₂R form heteromers with CB₁R in transfected cells. (A) The functionality of fusion proteins in HEK-293T cells transfected with 1.5 μg of cDNA corresponding to CB₁R, CB₂R, CB₂R-YFP, CB₁R-YFP or CB₂R-Rluc is shown. 72 h post-transfected cells expressing CB₂R, CB₂R-YFP or CB₂R-Rluc were treated for 7 min with vehicle (basal) or with JWH133 (100 nM) and cells expressing CB₁R or CB₁R-YFP were treated for 7 min with vehicle (basal) or with CP 55940 (500 nM) and ERK 1/2 phosphorylation was determined. Results (means ± s.e.m of 4 different experiments performed in duplicate) are in-folds over basal. Significant differences were analyzed by one way ANOVA followed by a Dunnett's multiple comparison post hoc test (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared to the basal). Above is a representative western blot. (B) Confocal microscopy images of cells transfected with the plasmid corresponding to CB₂R-YFP (1.5 μg), CB₂R-Rluc (0.5 μg) or CB₁R-YFP (1.5 μg) alone (top panels) or in combination (middle panels for CB₂R-Rluc and CB₂R-YFP and lower panels for CB₂R-Rluc and CB₁R-YFP). Proteins were identified by fluorescence or by immunocytochemistry as indicated in *Materials and Methods*. Colocalization is shown in yellow in merge panels. Scale bars, 10 μm. (C) BRET saturation experiments showing CB₁R-CB₂R heteromerization were performed as described in *Materials and Methods* using cells transfected with 0.2 μg of cDNA corresponding to CB₂R-Rluc and increasing amounts of cDNA (0 to 4 μg cDNA) corresponding to CB₁R-YFP (circles). As a negative control, cells were also transfected with cDNA corresponding to CB₁R-Rluc (0.2 μg) and dopamine D₄R-YFP (0 to 4 μg cDNA) (triangles). Both fluorescence and luminescence for each sample were measured before every experiment to confirm similar donor expressions (approximately 100000 bioluminescence units) while monitoring the increase in acceptor expression (100 to 20000 net fluorescence units). The relative amount of BRET is given as the ratio between the net fluorescence of the acceptor (YFP-YFP₀) and the luciferase activity of the donor (*Rluc*). BRET data are expressed as means ± s.e.m. of 4 different experiments grouped as a function of the amount of BRET acceptor.

Figure 2. CB₁R-CB₂R heteromers in neuroblastoma cells. (A) CB₁R and CB₂R mRNA expression in different neuroblastoma cells was analyzed by RT-PCR using total RNA from SH-SY5Y, SK-N-MC or NG108-15 neuroblastoma cells and specific common primers for the human and rat CB₂R, CB₁R or GAPDH as internal control of mRNA expression. As positive controls for the CB₂R expression, total RNA from human spleen or HEK-293T cells stably expressing hCB₂R (HEK CB₂) were used and RNA from HEK-293T cells (HEK-293T) or primers without RNA (control) were included as negative controls. (B) A schematic representation of the PLA technology is shown. Receptors were recognized by primary antibodies and secondary antibodies linked to different DNA chains, one plus and one minus. If the two receptors are close enough, the two different antibody-DNA probes are able to ligate. Following an amplification process the presence of fluorescently-tagged nucleotides allow detection of a punctuate fluorescent signal by confocal microscopy. (C) To test the specificity of rabbit anti CB₁R primary antibody, HEK-293T cells were transfected with CB₁R-YFP (1.5 µg plasmid) (upper panels) or CB₂R-YFP (1.5 µg plasmid) (lower panels) and immunocytochemistry performed with rabbit anti CB₁R as indicated in *Materials and Methods*. CB₁R or CB₂R expressing cells were identified by their own fluorescence and cell nuclei were stained with Hoechst (blue). Colocalization in merged images is shown in yellow. Scale bars, 10 µm. (D) Proximity Ligation Assay (PLA) in SH-SY5Y cells transfected with CB₂R-HA (3 µg plasmid) (upper panels) or without transfection (vehicle, lower panel). Red spots in three different fields from independent experiments with CB₂R expressing cells (upper panels) but not in non-transfected cells (lower panel) indicate the CB₁R-CB₂R heteromers expression. Scale bars, 20 µm.

Figure 3. CB₁R-CB₂R heteromers in rat brain. The Proximity Ligation Assay (PLA) was performed using primary cultures of rat pinealocytes (A and C) or rat nucleus accumbens slices

(B and D panels). Pinealocytes (A) or slices (B) were treated with rabbit CB₁R and CB₂R primary antibodies directly linked to plus and minus PLA probes (see Materials and Methods). CB₁R-CB₂R heteromers were visualized as red spots around blue colored Hoechst stained nucleus (A and B). Negative controls were performed with pinealocytes (C) or slices (D) treated with plus PLA probe-linked rabbit anti-CB₁R and with primary goat anti-D₄R detected with a minus PLA probe-linked secondary goat antibody. Scale bars, 20 μm. The percentage of pinealocytes (E) or nucleus accumbens neurons (F) containing one or more red spots versus total cells (blue nucleus) is given as well as *r* (number of red spots /total cells) values (E and F) from 8 fields in three different experiments.

Figure 4. Agonist and antagonist interactions between CB₁R and CB₂R on Akt/PKB phosphorylation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. SH-SY5Y cells (A) or SH-SY5Y cells transfected with 3 μg of cDNA corresponding to CB₂R-YFP (B, C and D) were used. In (A) and (B), cells were treated for 20min. with the agonists ACEA (100nM) or JWH 133 (50nM) alone or in combination or pretreated for 30 min with the antagonist AM630 (500nM) or AM251 (200nM) prior to agonist treatment. Akt/PKB phosphorylation was measured as indicated in *Materials and Methods*. Results (means ± s.e.m of 4 different experiments performed in duplicate) are in-folds over basal (non-stimulated cells). Significant differences were analyzed by a one way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni's tests (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared to basal. #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared to treated with ACEA alone. &*p* < 0.05, &&*p* < 0.01, &&&*p* < 0.001 compared to treated with JWH 133 alone). (C) Time-response curves of SH-SY5Y cells treated for the indicated times with 100nM ACEA (white bars) or 50nM JWH133 (black bars) alone or in combination (grey bars). Results (means ± s.e.m of 4 different experiments performed in duplicate) are in-folds over basal (non-stimulated cells). Significant differences were analyzed by a one way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni's tests (****p* < 0.001 compared to treated only with JWH 133. ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared to treated only with ACEA alone). (D) Effect of 30 min 500nM AM630 or 200nM AM251 antagonist pre-treatment in SH-SY5Y cells co-stimulated for 20 min with 100nM ACEA and

50nM JWH 133. Results (means \pm s.e.m of 4 different experiments performed in duplicate) are in-folds over basal (non-stimulated cells). No significant differences were detected in (D).

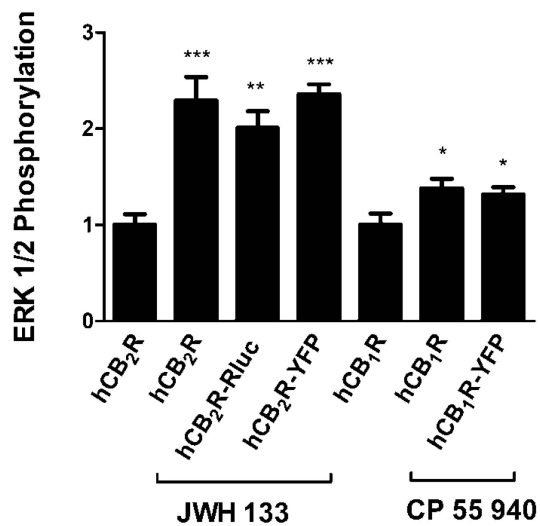
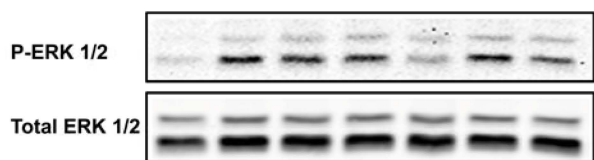
Figure 5. CB₁R-CB₂R heteromer fingerprint was found in rat globus pallidus. Globus pallidus slices were obtained as described in *Material and Methods* and treated for 10min with 500nM JWH 133 or 1 μ M ACEA, or pre-treated for 20 min with 5 μ M AM630 antagonist prior to agonist treatment. ERK 1/2 phosphorylation was determined as described in *Material and Methods*. Results (means \pm s.e.m of 2 different experiments performed in triplicate) are in-folds over basal (non-stimulated cells). Significant differences were analyzed by a one way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni's tests (* p < 0.05 compared to basal # p < 0.05 compared to the respective agonist-treated cells). Above is a representative western blot.

Figure 6. Agonist interactions between CB₁R and CB₂R on neurite outgrowth. SH-SY5Y neuroblastoma cells (A) or SH-SY5Y cells transfected with 3 μ g of cDNA corresponding to CB₂R-YFP (B and C) were treated for 24 h with 10 μ M retinoic acid (RA), 100nM ACEA or 50nM JWH 133 alone or in combination. Neurite outgrowth was measured as indicated in *Materials and Methods*. Results are expressed in percentage of differentiated cells vs. the total cell number in non-transfected cells or vs CB₂R-YFP expressing cells (detected by their own fluorescence) in transfected cells. Results are expressed as means \pm s.e.m. of 8 to 12 fields in three independent experiments. Significant differences between treated and non-treated cells (** p < 0.01, *** p < 0.001) or between co-activated cells compared to cells activated with JWH-133 (## p < 0.01) were determined by a one way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni's tests. In (C) a representative figure of cells expressing CB₂R-YFP (green) treated as in B is shown. Treated cells were fixed, permeabilized and processed for nuclear staining with Hoeschst (blue) and for immunocytochemistry with anti-MAP2 antibody (red).

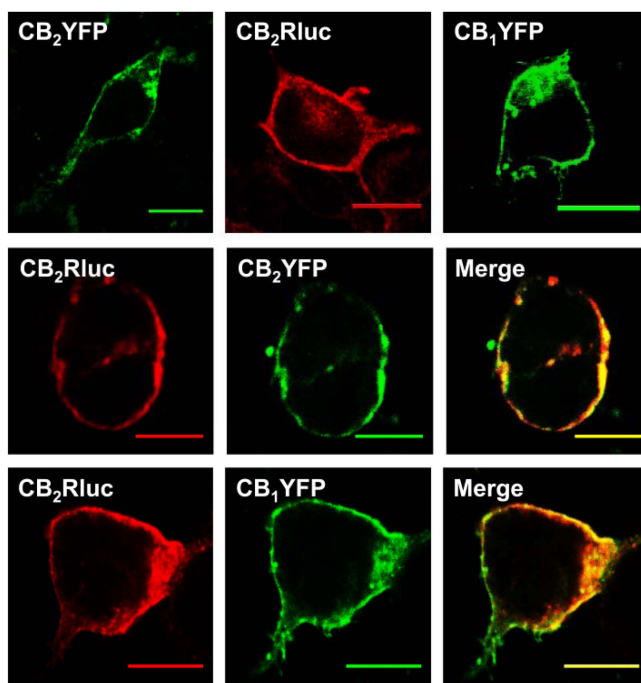
Figure 7. Antagonist interactions between CB₁R and CB₂R on neurite outgrowth. SH-SY5Y neuroblastoma cells (A) or SH-SY5Y cell transfected with 3 µg of cDNA corresponding to CB₂R-YFP (B) were treated for 24 h with 10µM retinoic acid (RA), 100nM ACEA or 50nM JWH 133 or pretreated for 30 min with 500nM AM630 or AM251 antagonist prior to agonist treatment. Neurite outgrowth was measured as indicated in *Materials and Methods*. Results are expressed in percentage of differentiated cells vs. the total cell number in non-transfected cells or vs CB₂R-YFP expressing cells (detected by its own fluorescence) in transfected cells. Results are expressed as means ± s.e.m. of 8 to 12 fields in three independent experiments. Significant differences between treated and non-treated cells (**p < 0.001) or between antagonized cells compared to cells activated with JWH 133 (###p < 0.001) or ACEA (&&p < 0.001) were determined by an one way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni's tests.

Figure 1

A



B



C

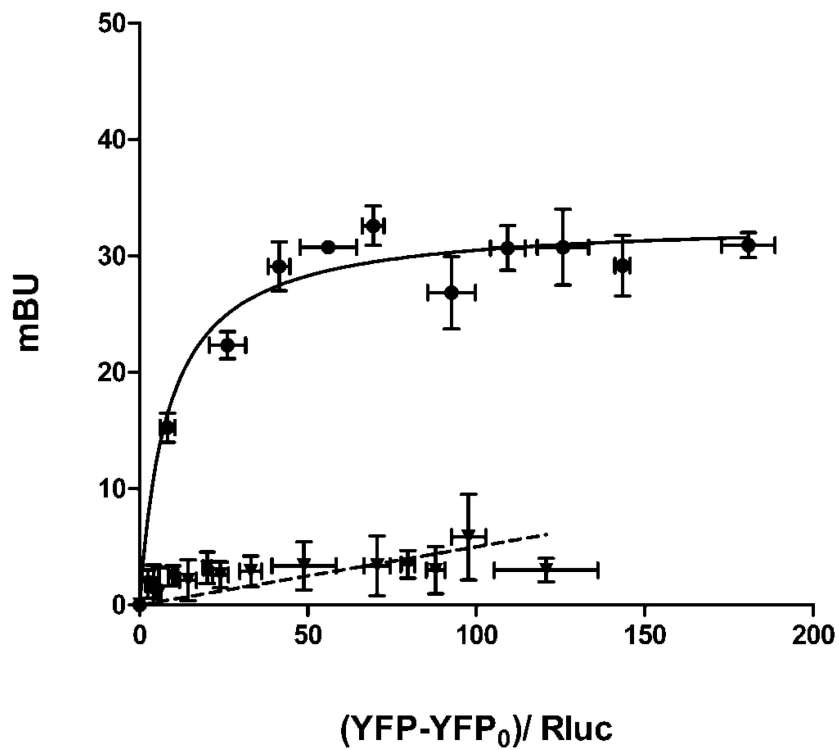
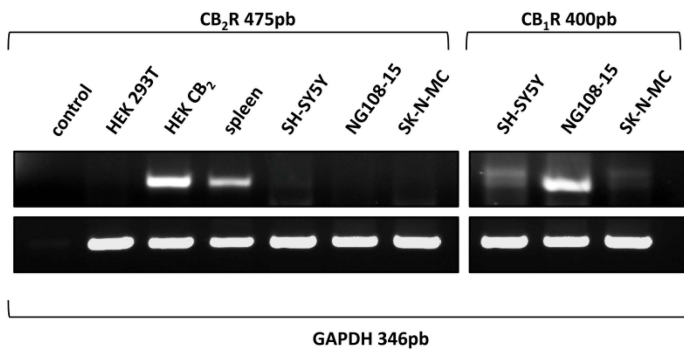
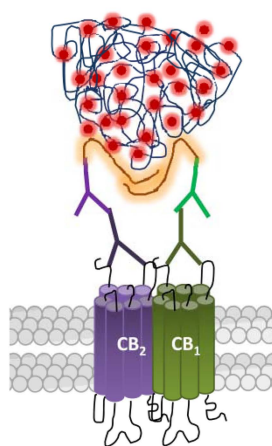


Figure 2

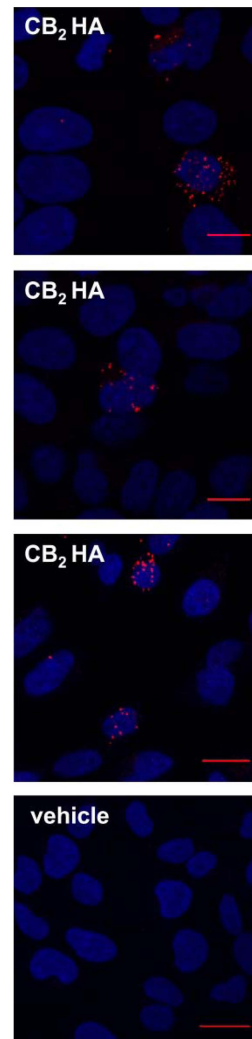
A



B



D



C

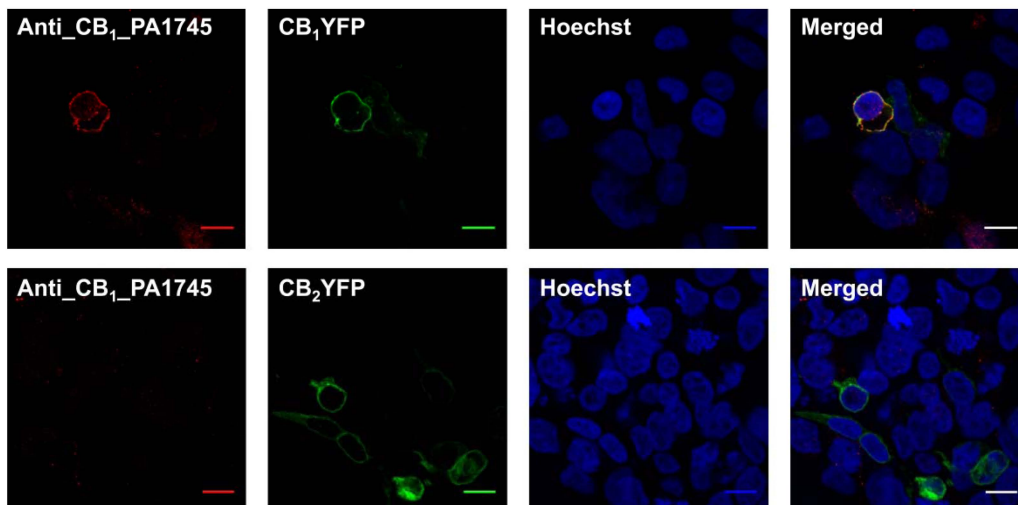


Figure 3

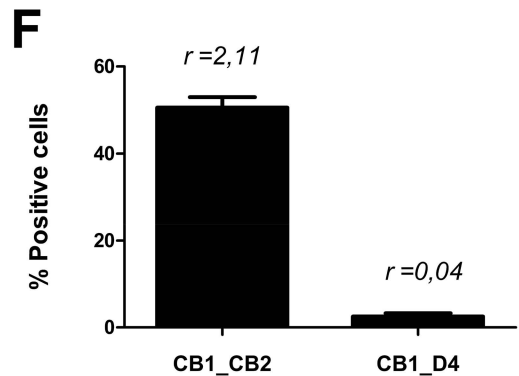
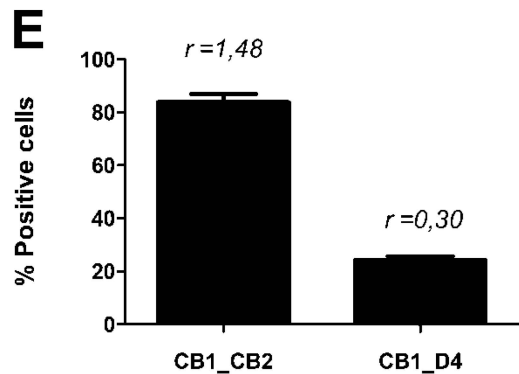
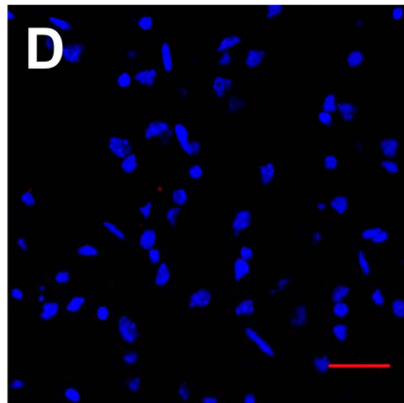
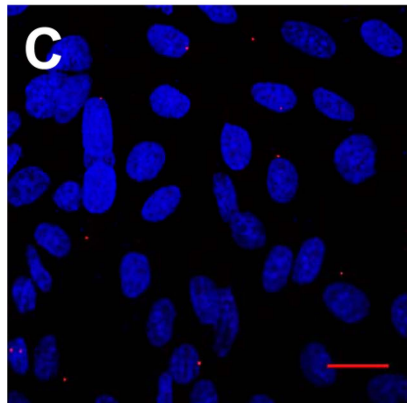
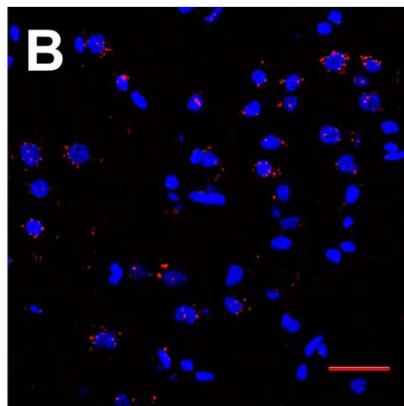
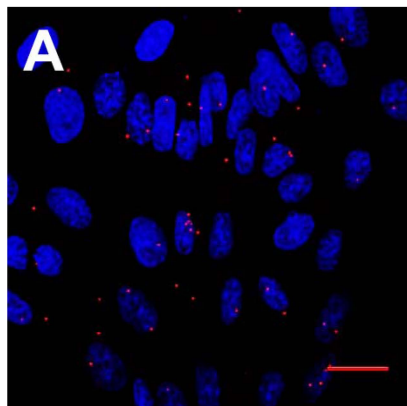
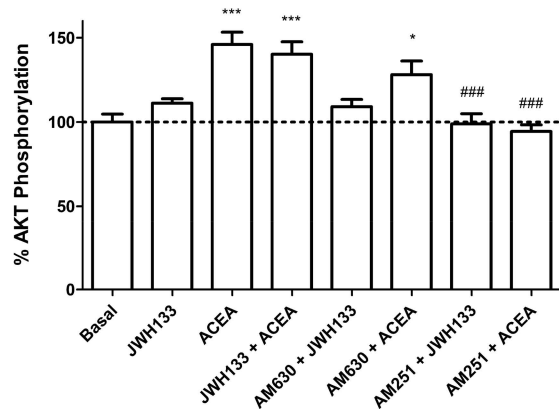
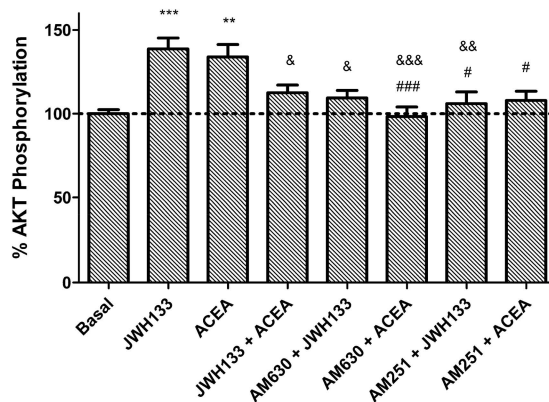


Figure 4

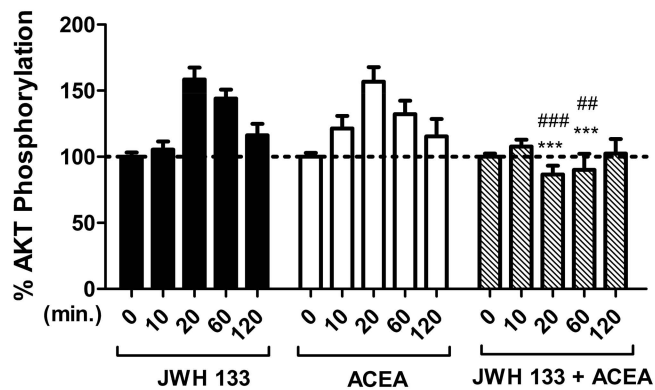
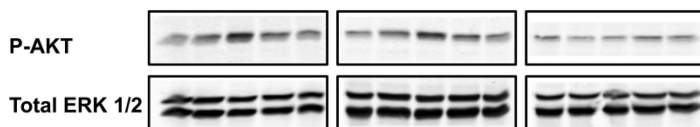
A



B



C



D

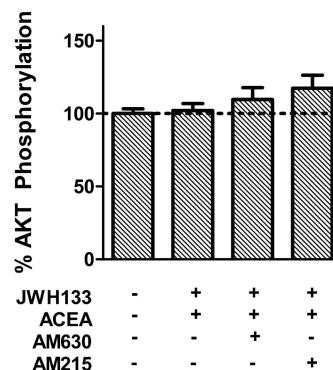
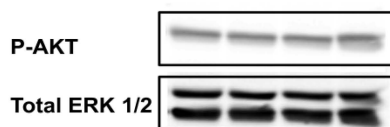


Figure 5

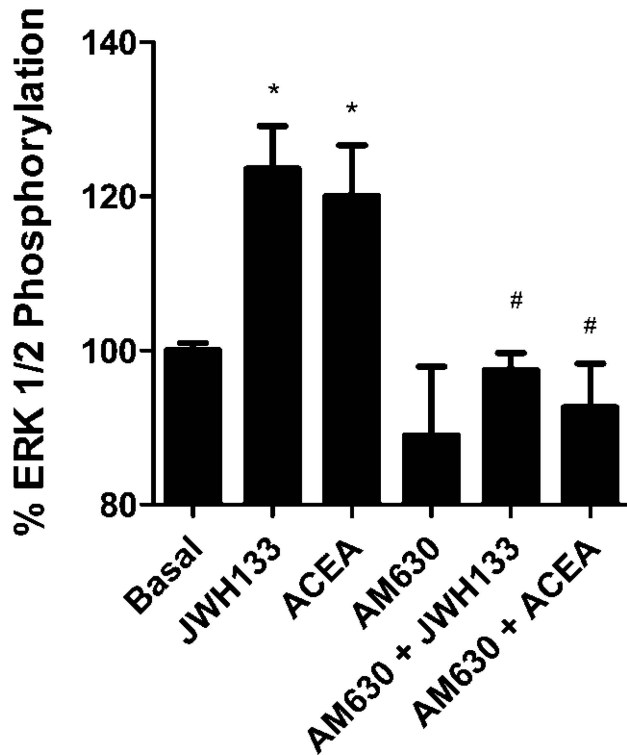
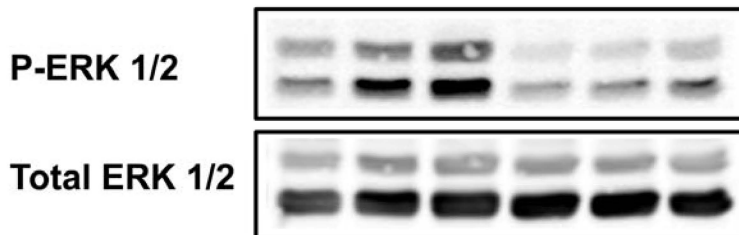
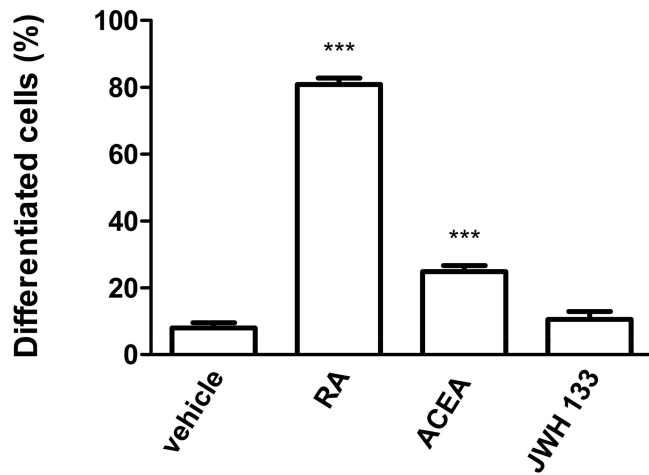
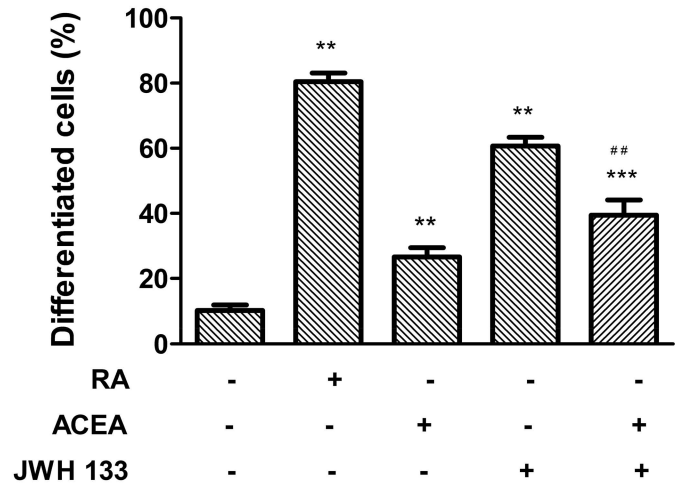


Figure 6

A



B



C

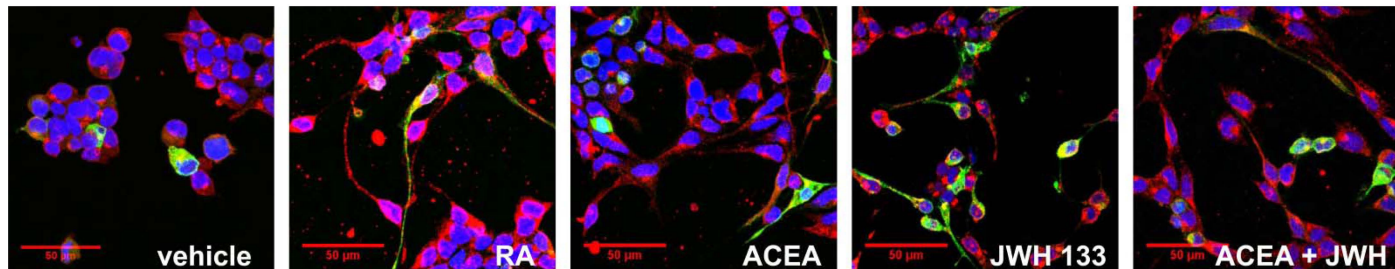
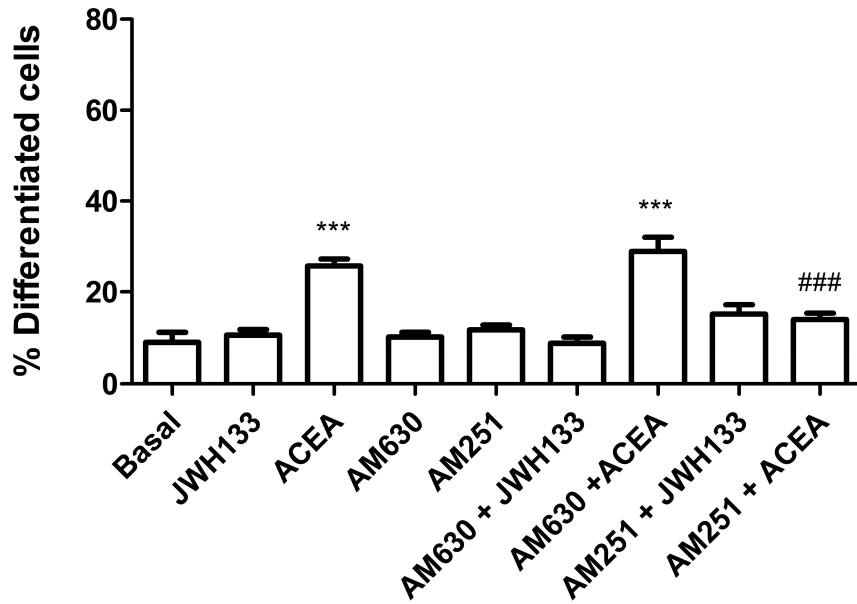
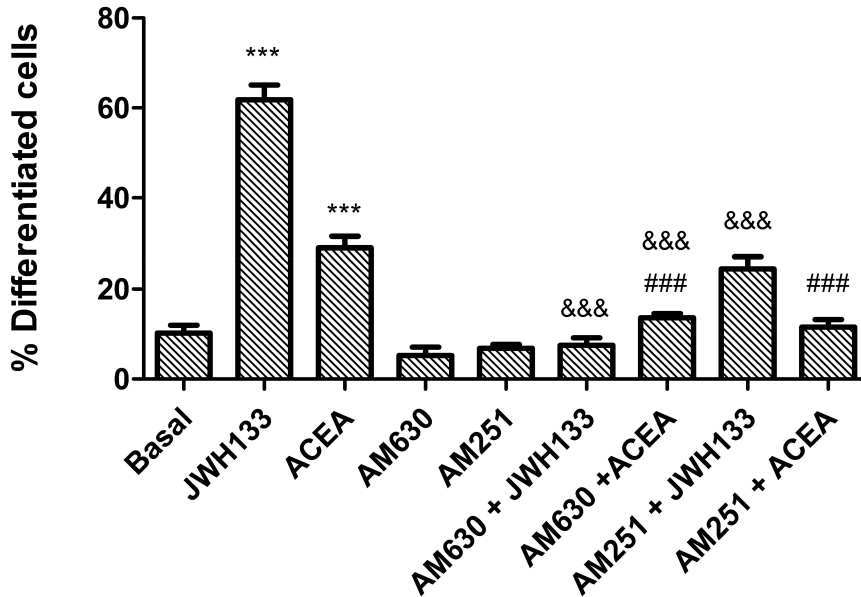


Figure 7

A



B



3.3.1. Anexo 1: Los CB₂R se expresan como homómeros en células transfectadas

Aunque clásicamente se pensaba que los GPCR se expresaban como monómeros de señalización individual, cada vez hay más evidencias de que la oligomerización es un proceso frecuente entre este tipo de receptores (Ferré et al., 2009). En la homomerización, son necesarios, al menos, dos moléculas de GPCR, que a la vez pueden interactuar con otros GPCR formando complejos heteroméricos de un orden mayor. Estudios de inmunoprecipitación, utilizando anticuerpos que reconocen específicamente la forma dimerica de los CB₁R, pero no su forma monomérica, han demostrado la existencia de homodímeros del CB₁R en el cerebro de rata (Wager-Miller et al., 2002; Mackie, 2005). Por el contrario, la homodimerización de los CB₂R todavía no ha sido explorada.

Con objeto de investigar esta posibilidad, se han utilizado las proteínas de fusión CB₂R-Rluc y CB₂R-YFP así como la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia Bioluminiscente (BRET) que se han descrito en el apartado anterior. En primer lugar, se evaluó la expresión subcelular de estos receptores, fusionados a Rluc o YFP, en función del tiempo transcurrido después de su transfección en células HEK 293T, comprobándose que el receptor no llegaba a localizarse completamente en la membrana celular hasta las 72 horas después de su transfección (Fig. 1A). Para examinar si los CB₂R podían formar homómeros en células vivas y si dicha formación dependía de su localización subcelular, se realizaron experimentos de BRET en células HEK293T, co-transfectadas de forma transiente, con cantidades constantes de cDNA correspondiente a CB₂R-Rluc y cantidades crecientes de cDNA correspondiente a CB₂R-YFP; y se evaluó su señal de BRET a las 48 y 72 horas después de su transfección. Como se observa en la Figura 1B y C la señal de BRET aumenta como una función hiperbólica de la cantidad de CB₂R-YFP expresado y aumenta de manera dependiente del tiempo de post-transfección transcurrido, siendo sustancialmente mayor a las 72 horas (Fig. 1C), cuando el receptor se encuentra preferentemente en la membrana celular, que a las 48 horas (Fig. 1B), cuando la mayor parte de los receptores se encuentran en el citoplasma. A partir de la curva de saturación a las 48 horas, se calculó un BRET_{max} de 64 ± 5

mBU y un $BRET_{50}$ de 22 ± 8 , mientras que para la curva a las 72 horas se determinó un $BRET_{max}$ de 96 ± 5 mBU y un $BRET_{50}$ de 15 ± 4 . La especificidad de la interacción se demostró comparando la curva de saturación de BRET con el BRET bajo y lineal obtenido para el control negativo, constituido por CB_2R -Rluc y receptores de dopamina D_4R -YFP, tanto a las 48 horas como a las 72 horas después de la transfección (Fig. 1B y C). Estos resultados indican que los receptores de CB_2 pueden formar homómeros cuando se co-expresan en células vivas, hecho éste que habrá de tenerse en cuenta a la hora de analizar sus propiedades farmacológicas y funcionales.

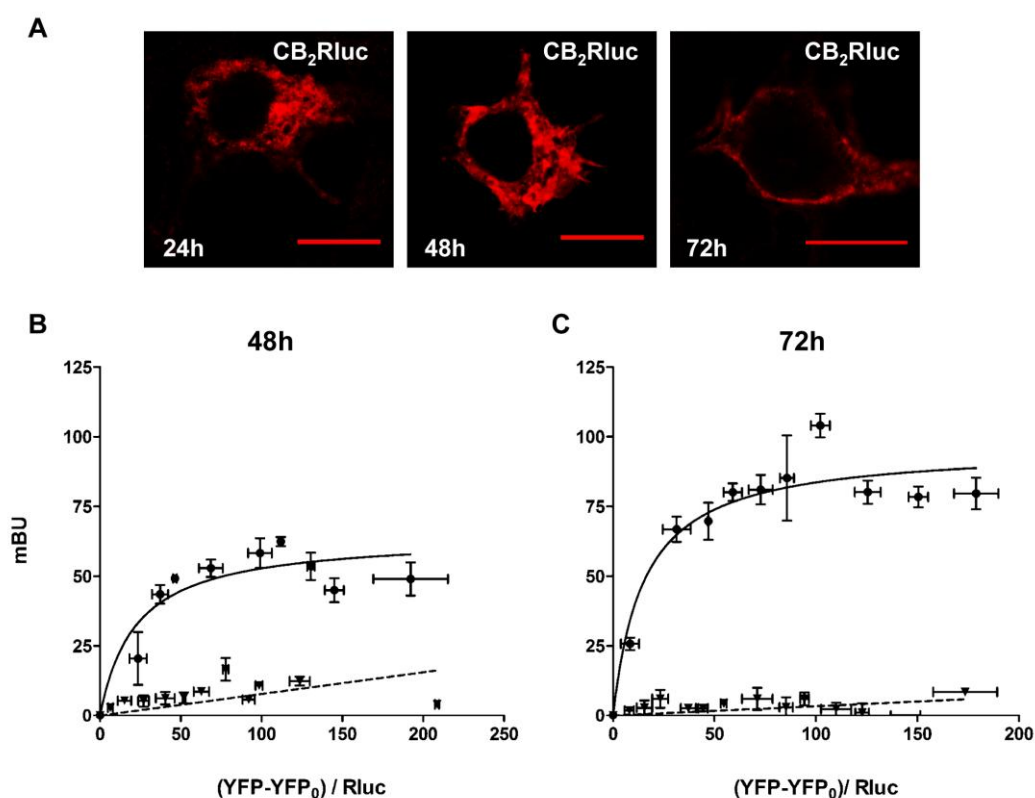


Figura 1. CB_2R forma homómeros en células transfectadas. (A) Imágenes de microscopía confocal de células transfectadas con el plásmido correspondiente a CB_2R -Rluc (0.5 μg) a 24 horas (panel izquierdo), 48 horas (panel medio) ó 72 horas (panel derecho) después de la transfección. Las proteínas se identificaron por inmunocitoquímica tal y como se indica en *Materiales y métodos*. Las barras de escala equivalen a 10 μm . (B-C) Los experimentos de saturación de BRET, mostrando la formación de dímeros CB_2R - CB_2R , se realizaron usando células transfectadas con 0.2 μg de cDNA correspondiente a CB_2R -Rluc y cantidades crecientes de cDNA (0 a 4 μg cDNA) correspondiente a CB_2R -YFP (círculos) a 48 horas (B) o 72 horas (C) después de la transfección, tal y como se describe en *Materiales y métodos*. Como control negativo, las células se transfectaron con el

3.Resultados

cDNA correspondiente a CB₂R-Rluc (0.2 µg) y dopamina D₄R-YFP (0 a 4 µg cDNA) (triángulos) y se determinó la señal de BRET a 48 horas (B) ó 72 horas (C) después de la transfección. Se comprobó tanto la fluorescencia como la luminiscencia para cada muestra antes de cada experimento con tal de confirmar una expresión uniforme del dador en todas las muestras (aproximadamente 100000 unidades de bioluminiscencia) y controlar el incremento en la expresión del aceptor (de 100 a 20000 unidades netas de fluorescencia). La cantidad relativa de BRET se expresa como la relación entre la fluorescencia neta del aceptor (YFP-YFP₀) y la actividad luciferasa del donador (Rluc). Los datos de BRET se expresan como medias ± s.e.m. de 4 experimentos diferentes agrupados como función de la cantidad de aceptor de BRET.



3.4. Anexo 2: Los CB₂R pueden formar heterómeros con otros GPCR como los receptores de serotonina o adenosina

INTRODUCCIÓN

Entre los miembros de la familia de las GPCR, la formación de homodímeros, heterodímeros y oligómeros de orden superior es un concepto cada vez más aceptado en la comunidad científica, y ha supuesto un cambio en la percepción clásica de los receptores de neurotransmisores, al considerarlos como agregados moleculares que constituyen una red de señalización horizontal asociativa en lugar de meras unidades monoméricas individuales (Ferré et al., 2009). La interacción molecular entre receptores, del mismo o distinto tipo, tiene como consecuencia la aparición de fenómenos de cooperatividad, modulación alostérica o *cross-talk* funcional entre las unidades que forman parte de los agregados, provocando cambios o modulaciones en su farmacología y señalización intracelular, y por ende, dando lugar a una mayor complejidad de actuación o regulación que podría explicar las interacciones funcionales observadas previamente entre los distintos sistemas de neurotransmisores (Bouvier, 2001; George et al., 2002; Franco et al., 2007). Aunque, inicialmente, la formación de heterodímeros se demostraba mediante la combinación de técnicas de unión de radioligando, western blot o coimmunoprecipitación en células o muestras de cerebro, en los últimos años, las técnicas de transferencia de energía, como el FRET y el BRET, han constituido una herramienta complementaria muy útil y más precisa para demostrar la capacidad de interacción física de los monómeros (Pfleger y Eidne, 2003, 2005; Ferré et al., 2009).

Con respecto a los receptores de cannabinoides, la capacidad de los CB₁R para formar heterómeros con otros GPCR ha sido ampliamente descrita. Así, la interacción física entre los receptores de dopamina D₂ y los CB₁R se ha demostrado mediante técnicas de coimmunoprecipitación y de transferencia de energía (Glass y Felder, 1997; Kearn et al., 2005; Marcellino et al., 2008). Este heterómero tiene la capacidad de acoplarse a una proteína G_s, a diferencia de los receptores expresados individualmente que están acoplados a las proteína G_i, y una de las consecuencias observables de tal interacción resulta en el *cross-talk* positivo en la señalización de MAPK (Jarrahian et al., 2004, 2; Mackie, 2005). Para el caso de los receptores de adenosina A_{2A} y los

CB₁R, la activación del heterodímero A_{2A}R-CB₁R, formado en el estriado de rata, es capaz de provocar cambios en la acción depresora motora ejercida por los cannabinoides (Carriba et al., 2007). El CB₁R también puede formar heterómeros con los receptores opioides, como el μ OR, los cuales señalizan a través una misma proteína Gq común (Hojo et al., 2008). Finalmente, la co-expresión de los receptores de orexina-1 y CB₁R, en las mismas células, induce la internalización conjunta mediada por ligando debido a la formación de heterómeros o complejos heteromultiméricos que están implicados en procesos de regulación del apetito, alimentación y vigilia (Ellis et al., 2006; Ward et al., 2011). A diferencia de la considerable descripción de los CB₁R a este respecto, se desconoce si los CB₂R tienen la misma capacidad de heteromerizar con otros receptores. La recién descubierta presencia de los CB₂R en neuronas, su expresión incrementada en procesos patológicos de neuroinflamación durante las distintas enfermedades neurodegenerativas, y aún más, su interacción funcional con otros sistemas de neurotransmisores sugiere que los efectos de los cannabinoides en el cerebro responden a una mayor complejidad y podrían estar mediados, no sólo a través de sus receptores individuales, sino a través de los posibles heterómeros con otros GPCR. Hete aquí lo trascendente de esta capacidad, ya que las posibilidades de diseño farmacológico y la especificidad de selección de sus dianas terapéuticas se multiplican considerablemente con tan sólo pensar en las distintas combinaciones de heterómeros y/o oligómeros posibles. En este Anexo, hemos querido abordar la posibilidad de que los CB₂R puedan formar heterómeros con otros GPCR mediante técnicas de transferencia de energía, teniendo en cuenta estudios previos que demuestran una interacción funcional entre el sistema cannabinoide y otros neurotransmisores como los adenosinérgicos y serotoninérgicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Proteínas de fusión y vectores de expresión.

Los cDNA humanos para los CB₂R, A_{2A}R, 5HT_{2C}R, y el receptor de dopamina D_{4.4} clonados en pcDNA3.1 se amplificaron sin los codones stop usando primers *sense* o *antisense* que comprendían la secuencia para las enzimas de restricción *EcoRI* o *BamHI* (CB₂R, A_{2A}R, 5HT_{2C}R) o *XhoI* y *EcoRI* (D_{4.4}R). Los fragmentos obtenidos se subclonaron manteniendo su pauta de lectura entre los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* (CB₂R, CB₁R) de un vector que expresa la enzima *Renilla luciferasa* (Rluc)

3.Resultados

(pRluc-N1, PerkinElmer, Wellesley, MA, Estados Unidos), o entre los lugares de restricción de *EcoRI* y *BamHI* (CB₂R, A_{2A}R, 5HT_{2C}R) o *XhoI* y *EcoRI* (D_{4.4}R) de un vector que expresa la proteína fluorescente EYFP (EYFP-N1; variante amarilla de la proteína GFP; Clontech, Heidelberg, Alemania), obteniendo así los plásmidos que expresan los receptores fusionados a Rluc o YFP en el extremo C-terminal del receptor (CB₂R-Rluc, CB₁R-Rluc, CB₂R-YFP, A_{2A}R-YFP, 5HT_{2C}R-YFP o D₄R-YFP). La expresión en la membrana de las proteínas de fusión se evaluó en el microscopio confocal.

Cultivo de líneas celulares y transfección

La línea celular embrionaria de riñón (HEK-293T) o la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y crecieron en medio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM) suplementado con 100 U/ml penicilina/streptomina, 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS), L-glutamina 2mM y piruvato de sodio 1mM para células SH-SY5Y. Todos los medios y suplementos provinieron de Invitrogen (Paisley, Scotland, Reino Unido). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂, y se realizaron los pases pertinentes cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia.

Las células HEK-293T o SH-SY5Y se transfectaron de manera transitoria con el cDNA de la correspondiente proteína de fusión por el método de PEI ramificado (PolyEthylenImine, Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos). Se incubaron (4 h) conjuntamente con el cDNA, el PEI ramificado (5 ml de PEI 10 mM por cada mg de cDNA) y NaCl 150 mM en medio sin suero. Después de 4 horas, se cambió el medio sin suplementar con medio fresco suplementado. 48 ó 72 horas después de la transfección, las células se lavaron sucesivamente dos veces con la solución equilibrada de sales de Hank, HBSS (NaCl 137mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.34mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, CaCl₂·2H₂O 1.26 mM, MgSO₄·7H₂O 0.4 mM, MgCl₂ 0.5 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4) suplementada con glucosa 0.1% (p/v), se levantaron suavemente con una pipeta y se resuspendieron en la misma solución. Para controlar el número de células, la concentración de proteína se determinó usando el kit de Bradford (Bio-Rad, Munich, Alemania) y diluciones estandarizadas de albúmina bovina sérica.

Inmunomarcaje

Después de 24, 48 ó 72 h de transfección, las células HEK-293T se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 min y se lavaron con tampón de fosfato salino (PBS; NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na₂HOP₄ 4.mM, KH₂OP₄ 1.5 mM, pH 7.3) que contenía glicina 20 mM. Después de la permeabilización durante 5 min con PBS-glicina que contenía Triton X-100 0.05%, las células se incubaron con PBS suplementado con albúmina bovina sérica al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. La proteína de fusión receptor-Rluc se marcó entonces con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-Rluc (1:100, Chemicon, Billerica, MA) durante 1 h, se lavó y se incubó posteriormente con un anticuerpo secundario de burro anti-ratón conjugado a Cy3 (1:200, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, Estados Unidos). La proteína-YFP se detectó por su propia fluorescencia. Las muestras se lavaron varias veces, se montaron en portaobjetos con un medio apropiado para inmunofluorescencia (Mowiol 30%, Calbiochem, Darmstadt, Alemania) y se observaron en el microscopio confocal Leica SP2.

Ensayos de Transferencia de Energía de Resonancia Bioluminiscente (BRET)

Las células HEK-293T se co-transfectaron transitoriamente con las cantidades de cDNA correspondientes a las proteínas de fusión indicadas en los pie de figura. Para cuantificar la fluorescencia, las células, resuspendidas en HBSS (equivalente a 20 µg de proteína), se distribuyeron en microplacas de 96 pocillos (placas negras con el fondo transparente; Porvair, King's Lynn, Reino Unido) y se leyó su fluorescencia en el fluorímetro FluoStar Optima (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) equipado con una lámpara de flash de xenón de alta energía, usando para la lectura un filtro de excitación a 400nm. La fluorescencia de los receptores fusionados a la proteína YFP se determinó como la fluorescencia de la muestra menos la autofluorescencia de las células que sólo expresaban la proteína Rluc. Para las lecturas del BRET, la suspensión celular equivalente a 20 µg de proteína fue distribuída en microplacas de 96 pocillos (Corning 3600, placas blancas; Sigma) y se les añadió coelenterazina H 5 µM (Molecular Probes, Eugene, OR). Transcurrido 1 minuto después de la adición de coelenterazina H, se tomaron las lecturas usando el fluorímetro Mithras LB 940 (Berthold, Bad Wildbad, Alemania) que permite la integración de señales detectadas en el filtro de longitud de onda corto a 485 nm y el de longitud de onda largo a 530 nm. Para cuantificar la

3.Resultados

luminiscencia de los receptores fusionados a la Rluc se llevaron a cabo lecturas de luminiscencia a los 10 minutos después de la adición de coelenterazina H 5 μ M. Las células que expresaban únicamente el dador de BRET (receptor-Rluc) se usaron para determinar la señal de fondo. El BRET neto se define como [(emisión a la longitud de onda larga)/(emisión a la longitud de onda corta)]-Cf, dónde Cf corresponde a [(emisión a la longitud de onda larga)/(emisión a la longitud de onda corta)] para el receptor fusionado a Rluc expresado individualmente en el mismo experimento. Las curvas de BRET se ajustaron empleando ecuaciones de regresión no lineales, asumiendo una fase única, con el software GraphPad Prism (San Diego, CA, Estados Unidos).

Determinación de la fosforilación de ERK 1/2

Las células HEK 293T, que expresaban transitoriamente las proteínas indicadas en cada caso, se cultivaron con medio libre de suero durante 16 h antes de ser tratadas o no con los distintos agonistas durante el tiempo indicado. Las células se lavaron con PBS y se lisaron mediante la adición de 500 μ L de tampón de lisis a 4° (Tris-HCl pH 7.4 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, β -glicerofosfato 45 mM, Tritón X-100 1%, óxido de fenil-arsina 20 μ M, NaVO₄ 0.4 mM y cóctel de inhibidor de proteasas). Los desechos celulares se eliminaron por centrifugación a 13,000 g durante 5 min a 4°C y la proteína se cuantificó usando el método del ácido biocinconínico y diluciones estándar de albúmina bovina sérica. Se separaron cantidades equivalentes de proteína (10 μ g) por electroforesis en un gel de poliacrilamida y SDS al 7.5% y las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF-FL. La membrana se incubó con el tampón de bloqueo Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) durante 90 min y posteriormente toda la noche con una mezcla del anticuerpo de ratón anti-fosfo-ERK1/2 (1:2500, Sigma), para medir la fosforilación de ERK 1/2, y el anticuerpo de conejo anti-ERK1/2 (1:40000, Sigma) que reconoce tanto las ERK 1/2 fosforiladas como las no fosforiladas, usado como control de carga de la proteína. Las bandas se visualizaron por incubación con una mezcla de un anticuerpo anti-conejo IRDye 680 (1:10000, Sigma) y un anticuerpo anti-ratón IRDye 800 (1:10000, Sigma) durante 1 h. La membrana se escaneó mediante el escáner de infrarrojos de Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos). Las densidades de cada banda se cuantificaron usando un programa de software exportado a Excel (Microsoft, Redmond, WA, Estados Unidos).

El nivel de proteína fosforilada se normalizó respecto a la intensidad de las bandas de proteína ERK 1/2 total.

Evaluación de la neuritogénesis

Las células SH-SY5Y se sembraron en cubres de borosilicato de 10 mm de diámetro y se transfectaron o no con 3 μ g de cDNA correspondiente a CB₂R-YFP. 48 horas después de la transfección, las células se incubaron durante 24 horas en medio libre de suero en ausencia o presencia de ácido retinoico 10 μ M, CGS 21680 100 nM, o JWH 133 50 nM (todos ellos procedentes de Tocris, Bristol, Reino Unido) solos o en combinación. A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 min, se volvieron a lavar con PBS que contenía glicina 20mM, se permeabilizaron durante 5 minutos con PBS-glicina que contenía Tritón-100 al 0.05% y se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se marcaron durante 1 h con el anticuerpo primario de ratón anti-MAP2 (1:200, Calbiochem, San Diego, CA, Estados Unidos) y después de lavarlas se marcaron con un anticuerpo secundario IgG de burro anti-ratón conjugado con Cy3 (1:200 dilution, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Estados Unidos). El marcaje nuclear se llevó a cabo con Hoeschst (1:1000, 1 mg/ml, Sigma). Los cubres se lavaron durante 5 min en PBS que contenía BSA al 1%, 5 min con PBS-glicina y se montaron con medio de montaje Mowiol. Las observaciones se realizaron con un microscopio confocal Leica TCS SP2 con un objetivo de 40X. Los cuerpos celulares y las neuritas se contaron en 8-12 campos, seleccionados al azar, en al menos tres experimentos independientes, usando el software Image J. Se consideraron células en diferenciación aquellas que tenían al menos una neurita mayor que el cuerpo celular. Los resultados se expresaron como porcentaje de células diferenciadas frente al número total de células, en el caso de células no transfectadas, o frente al número total de células que expresaban CB₂R-YFP (detectadas por su propia fluorescencia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los CB₂R forman heterómeros con los receptores de adenosina A_{2A}

Para estudiar la posible formación de heterómeros A_{2A}R-CB₂R, se utilizaron las proteínas de fusión CB₂R-Rluc y A_{2A}R-YFP y se comprobó previamente su

3.Resultados

colocalización en la membrana en función del tiempo después de la transfección. Pasadas las 72 h de transfección, los receptores se expresaban mayoritariamente en la membrana plasmática mientras que a las 48 horas, a pesar de existir una completa colocalización, los receptores se encontraban preferentemente en una localización intracelular (Fig. 1C). Los experimentos de Transferencia de Energía de Resonancia Bioluminiscente (BRET) se realizaron en células HEK293T, co-transfectadas de forma transitoria con una cantidad constante de cDNA correspondiente a CB₂R-Rluc y cantidades crecientes de cDNA correspondiente a A_{2A}R-YFP, y se evaluó la señal de BRET a las 48 y 72 h después de su transfección (Fig. 1A y B). La señal de BRET aumenta como una función hiperbólica de la cantidad de A_{2A}R-YFP expresado, alcanzando un valor similar de BRET máximo a las 48 ó 72 h después de la transfección, de forma independiente a la localización subcelular. La curva de saturación a las 48 h presentó un BRET_{max} de 40 ± 3 mBU y un BRET₅₀ de 8 ± 3 , mientras que para la curva a las 72 h se determinó un BRET_{max} de 39 ± 4 mBU y un BRET₅₀ de 17 ± 8 . La especificidad de la interacción se demostró comparando la curva de saturación de BRET con el BRET bajo y lineal obtenido para el control negativo constituido por CB₂R-Rluc y D₄R-YFP tanto a las 48 como a las 72 h después de la transfección (Fig. 1A y B). Estos resultados indican que los CB₂R pueden formar heterómeros con los A_{2A}R en células cotransfectadas y que, probablemente, la formación de estos heterómeros ocurre a nivel del retículo endoplasmático.

Para investigar las implicaciones funcionales de los heterómeros A_{2A}R-CB₂R, se ha estudiado un proceso de neuritogénesis en células de neuroblastoma, utilizado como modelo neuronal. La implicación de A_{2A}R así como la de los CB₂R durante los procesos de neuritogénesis, en células SH-SY5Y, había sido establecida previamente (Canals et al., 2005; Callen et al., 2012). La neuritogénesis es un proceso de formación de neuritas durante la diferenciación neuronal, entendiéndose como neurita aquella proyección previa a la formación de posteriores dendritas o axones que tiene una elongación mayor que el cuerpo celular y está formada por microtúbulos de comportamiento dinámico. Una célula puede considerarse en diferenciación cuando presenta al menos una neurita. El neuroblastoma SH-SY5Y se ha utilizado ampliamente para estudiar estos procesos *in vitro*, ya que estas células desarrollan largas extensiones y presentan marcadores neuronales cuando se tratan con ésteres de forbol o ácido

retinoico (Påhlman et al., 1984; Encinas et al., 2000). Dichos neuroblastomas, además, expresan endógenamente el A_{2A}R y CB₁R, pero no los CB₂R (Carriba et al., 2007; Callen et al., 2012); por ello, se utilizaron células no transfectadas que expresan los receptores A_{2A} y CB₁, y células transfectadas con CB₂R-YFP que expresan los tres receptores. EL tratamiento con CGS 21680, agonista selectivo de los A_{2A}R, inducía la formación de neuritas en un 70-80%, tanto en células no transfectadas (Fig. 1D) como en las transfectadas con el cDNA correspondiente al CB₂R (Fig. 1E). El tratamiento con JWH 133, agonista selectivo de los CB₂R, no inducía la neuritogénesis en las células SH-SY5Y no transfectadas, tal y como se esperaba dado que no expresaban el CB₂R (Fig. 1D), pero sí lo hacía en un 60% en las células que lo expresaban (Fig. 1E). La estimulación conjunta de ambos receptores con CGS 21680 y JWH 133 no aumentaba ni disminuía significativamente la neuritogénesis con respecto a la estimulación del CGS 21680 solo (Fig. 1E), lo que sugiere un moderado cross-talk negativo entre ambos receptores. Por otro lado, en células no transfectadas, el agonista selectivo de CB₁R, ACEA, también es capaz de inducir la neuritogénesis, aunque en menor medida que el CGS 21680, y la estimulación conjunta con CGS 21680 y ACEA da lugar a una neuritogénesis menor que la observada con CGS 21680 de manera individual (Fig. 1D) sugiriendo, en este caso, un claro crosstalk negativo entre ellos.

Para confirmar la modulación negativa entre receptores en el heterómero CB₂R-A_{2A}R se analizó la fosforilación de ERK 1/2, dado que ambos receptores señalizan a través de las proteínas MAPK (Carrier et al., 2004; Palazuelos et al., 2006; Sexl et al., 1997; Schulte y Fredholm, 2003). Se estudiaron los cambios en la fosforilación de las proteínas ERK 1/2 en células HEK293T co-transfectadas de manera transitoria con CB₂R y A_{2A}R y tratadas con los agonistas de ambos receptores. Tanto el tratamiento con CGS 21680 100nM, agonista selectivo para el receptor de A_{2A}R, como el tratamiento con JWH 133 50nM, agonista selectivo para el CB₂R, inducían la fosforilación de ERK 1/2 cuando se añadían a las células de manera individual (Fig. 1F). Sin embargo, la co-estimulación con ambos agonistas dio lugar a una fosforilación inferior a la que correspondería a la suma de aquella inducida por los tratamientos individuales (Fig. 1F), sugiriendo, de nuevo, un moderado cross-talk negativo entre ambos receptores.

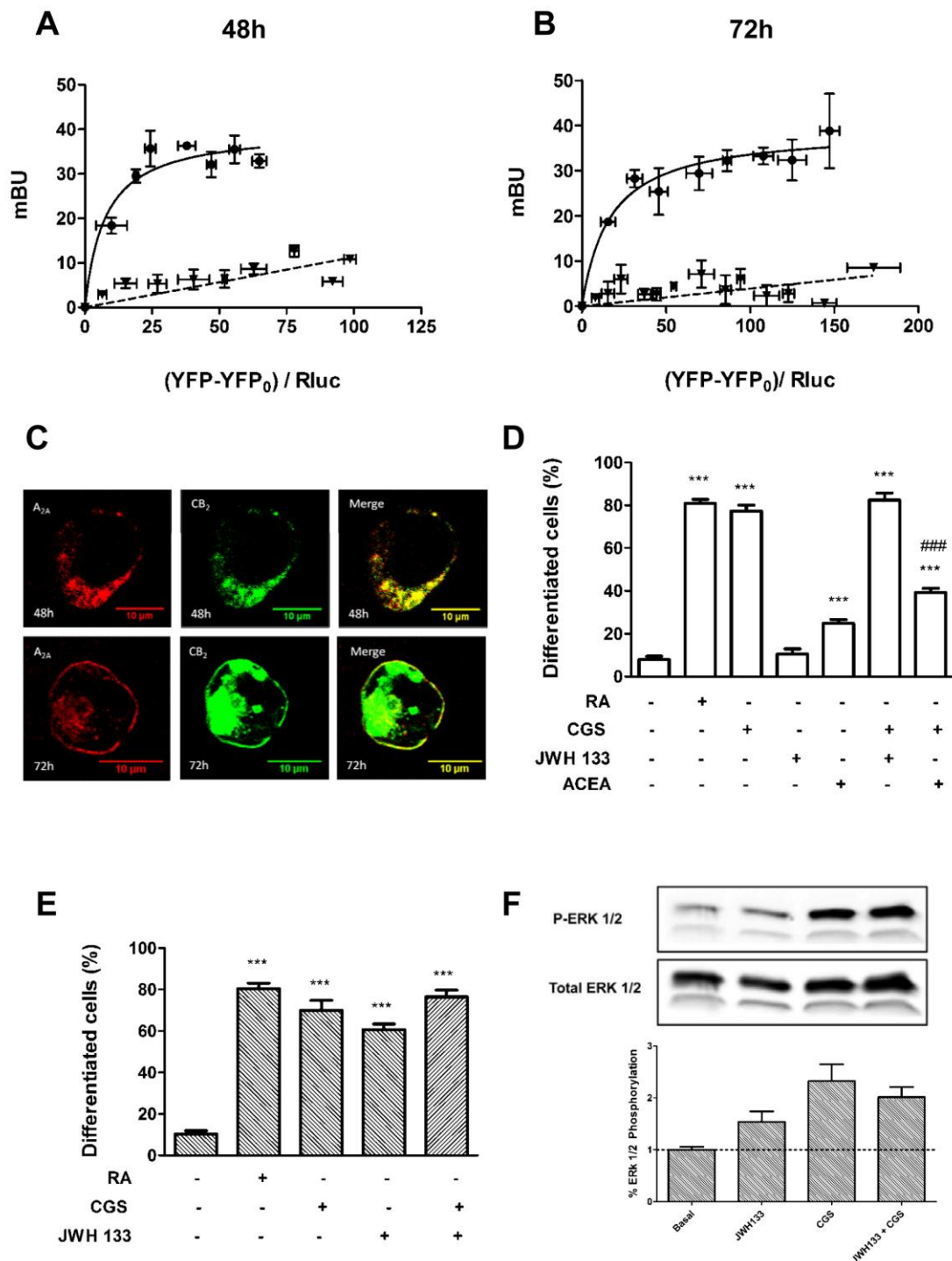


Figura 1. Los CB₂R forman heterómeros con los A_{2A}R en células transfectadas. (A-B) Los experimentos de saturación de BRET se realizaron usando células HEK 293T transfectadas con 0.2 μg de cDNA correspondiente a CB₂R-Rluc y cantidades crecientes de cDNA (0 a 6 μg cDNA) correspondiente a A_{2A}R-YFP (círculos), después de 48 horas (A) ó 72 horas (B) de la transfección, tal y cómo se describe en *Materiales y métodos*. Como control negativo, las células se transfectaron con el cDNA correspondiente a CB₂R-Rluc (0.2 μg) y dopamina D₄R-YFP (0 a 4 μg cDNA), y se determinó BRET en

las mismas condiciones (triángulos en A y B). Se midió tanto la fluorescencia como la luminiscencia para cada muestra antes de cada experimento con tal de confirmar una expresión uniforme del dador en todas las muestras (aproximadamente 100000 unidades de luminiscencia) y controlar el incremento en la expresión del aceptor (de 100 a 20000 unidades netas de fluorescencia). La cantidad relativa de BRET se expresa como la relación entre la fluorescencia neta del aceptor (YFP-YFP₀) y la actividad luciferasa del donador (Rluc). Los datos de BRET se expresan como medias \pm s.e.m. de 4 experimentos diferentes agrupados como función de la cantidad de aceptor de BRET. (C) Imágenes al microscopio confocal de células co-transfectadas con los plásmidos correspondientes a A_{2A}R-Rluc (0.5 μ g) y CB₂R-YFP (1.5 μ g) a 48 h (paneles superiores) ó 72 h (paneles inferiores) después de la transfección. Las proteínas se identificaron por su propia fluorescencia o por inmunocitoquímica, tal y como se indica en *Materiales y métodos*. La co-localización se muestra en amarillo en los paneles de la derecha. Las barras de escala equivalen a 10 μ m. En (D-E) los neuroblastoma SH-SY5Y no transfectados (D) o transfectados con 3 μ g de cDNA correspondiente a CB₂R-YFP (E) se trataron durante 24 h con ácido retinoico 10 μ M (RA), CGS 21680 100nM, JWH 133 50nM o ACEA 100nM, solos o en combinación. El crecimiento de neuritas se midió tal y como se indica en *Materiales y métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de células diferenciadas frente al número total de células en las células no transfectadas (D) o frente al número total de células que expresan CB₂R-YFP (detectado por su propia fluorescencia) en células transfectadas (E). Los resultados se expresan como medias \pm s.e.m. de 8 a 12 campos en tres experimentos diferentes. Se muestran las diferencias significativas respecto a las células no tratadas con agonista (**p < 0.001) y respecto a las tratadas con CGS 21680 (###p < 0.001) calculadas por one way ANOVA seguido del test post hoc de Bonferroni de comparación múltiple. En (F) las células HEK 293T, transfectadas con 0,5 μ g de cDNA correspondiente a CB₂R y 0,5 μ g de cDNA correspondiente a A_{2A}R, se trataron durante 10 min con los agonistas CGS 21680 (100nM) o JWH 133 (50nM) solos o en combinación. La fosforilación de ERK 1/2 se midió tal y como se indica en *Materiales y Métodos*. Los resultados (medias \pm s.e.m de 3 experimentos diferentes por duplicado) son *in-folds* sobre el basal (células no estimuladas). Las diferencias significativas se analizaron por one way ANOVA seguido por el test post-hoc de Bonferroni (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 comparados con el basal).

La formación de heterómeros entre los receptores de adenosina y de cannabinoides sólo puede tener sentido fisiológico si existen neuronas que los co-expresen. Los A_{2A}R y los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂ se encuentran presentes en las neuronas medias espinosas estriatales de rata (Ciruela et al., 2006; Martín et al., 2008; Gong et al., 2006). Se ha sugerido que la señalización *in vivo* de los CB₁R, que controlan la actividad motora, es dependiente de la activación del receptor de los A_{2A}R (Carriba et al., 2007). En el núcleo accumbens, además, los CB₂R parecen mediar los efectos de estimulación locomotora y de recompensa ejercidos por la cocaína (Xi et al., 2011) mientras los A_{2A}R incrementan su expresión en el estriado ventral durante la autoadministración continuada de cocaína en ratas (Marcellino et al., 2007).

3.Resultados

Este marco propone al estriado como región candidata dónde los heterómeros entre los receptores de adenosina y de cannabinoides puedan tener un papel funcional significativo.

Los CB₂R forman heterómeros con los receptores de serotonina 5HT_{2c}

Para estudiar la posible formación de heterómeros CB₂R-5HT_{2c}R, se han utilizado técnicas de Transferencia de Energía Bioluminiscente como el BRET, para lo cual se emplearon las proteínas de fusión CB₂R-Rluc y 5HT_{2c}R-YFP. En primer lugar, se estudió su expresión subcelular y su colocalización en la membrana plasmática pasadas 48 ó 72 h después de la co-transfección en células HEK 293T. Los receptores colocalizaban en la membrana plasmática a ambas horas de post-transfección, pero se observaba mayor grado de coexpresión a las 72 h (Fig. 2A). La heteromerización de dichos receptores se determinó mediante ensayos de BRET en las mismas células HEK293T co-transfectadas, de forma transitoria, con una cantidad constante de cDNA correspondiente a CB₂R-Rluc y cantidades crecientes de cDNA correspondiente a 5HT_{2c}R-YFP y se evaluó la señal de BRET a las 48 y 72 h después de su transfección (Fig. 2B y C). La señal de BRET aumentó como una función hiperbólica de la cantidad de 5HT_{2c}R-YFP expresado, alcanzando un BRET máximo que resultó mayor a las 72 h después de la transfección, lo cual correlacionaba con la mayor colocalización observada en la membrana plasmática a este mismo tiempo. La curva de saturación a las 48 h dio lugar a un BRET_{max} de 23 ± 2 mBU y un BRET₅₀ de 17 ± 4 , mientras que para la curva a las 72 h se determinó un BRET_{max} de 30 ± 1 mBU y un BRET₅₀ de 2 ± 1 . La especificidad de la interacción se demostró comparando la curva de saturación de BRET con el BRET bajo y lineal obtenido para el control negativo constituido por CB₂R-Rluc y D₄R-YFP, tanto a las 48 h como a las 72 h después de la transfección (Fig. 2B y C). Estos resultados indican que los receptores de CB₂ pueden formar heterómeros con los receptores 5HT_{2c} en células co-transfectadas.

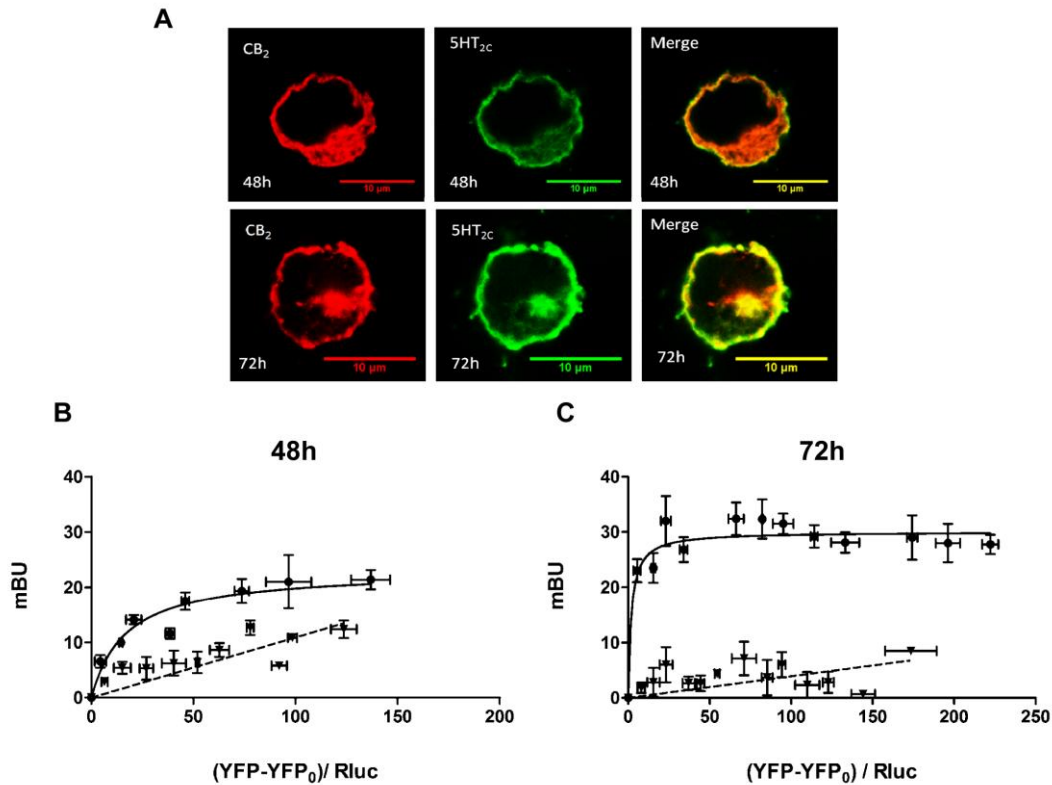


Figura 2. Los CB₂R forman heterodímeros con los receptores 5HT_{2C} de serotonina en células transfectadas. (A) Imágenes al microscopio confocal de células co-transfectadas con los plásmidos correspondientes a CB₂R-Rluc (0.5 μg) y 5HT_{2C}-YFP (1.5 μg) a 48 h (paneles superiores) ó 72 h (paneles inferiores) después de la transfección. Las proteínas se identificaron por su propia fluorescencia o por inmunocitoquímica, tal y como se indica en *Materiales y métodos*. La colocalización se muestra en amarillo en los paneles de la derecha. Las barras de escala equivalen a 10 μm. (B-C) Los experimentos de saturación de BRET se realizaron usando células transfectadas con 0.2 μg de cDNA correspondiente a CB₂R-Rluc y cantidades crecientes de cDNA (0 a 6 μg cDNA) correspondiente a 5HT_{2C}-YFP (círculos) a 48 h (B) ó 72 h (C) después de la transfección, tal y como se describe en *Materiales y métodos*. Como control negativo, las células se transfectaron con el cDNA correspondiente a CB₂R-Rluc (0.2 μg) y dopamina D₄R-YFP (0 a 4 μg cDNA) (triángulos) en las mismas condiciones. Se determinó tanto la fluorescencia como la luminiscencia para cada muestra antes de cada experimento con tal de confirmar una expresión uniforme del dador en todas las muestras (aproximadamente 100000 unidades de bioluminiscencia) y controlar el incremento en la expresión del aceptor (de 100 a 20000 unidades netas de fluorescencia). La cantidad relativa de BRET se expresa como la relación entre la fluorescencia neta del aceptor (YFP-YFP₀) y la actividad luciferasa del dador (Rluc). Los datos de BRET se expresan como medias ± s.e.m. de 4 experimentos diferentes agrupados como función de la cantidad de aceptor de BRET.

Diversos hechos experimentales sugieren que los efectos antidepresivos de los cannabinoides están mediados por la interacción funcional con el sistema serotoninérgico: La serotonina es capaz de aumentar la afinidad del agonista no selectivo WIN55,212-2 en membranas cerebelares de rata, y, al mismo tiempo, el

3.Resultados

tratamiento con WIN55,212-2 a bajas dosis estimula las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal, acción ésta que es posible mimificar con un inhibidor de FAAH capaz de aumentar la anandamida cerebral. Se ha sugerido que estas acciones están mediadas por los CB₁R, ya que es posible bloquearlas mediante un antagonista selectivo de los CB₁R, rimonabant (Gobbi et al., 2005; Devlin y Christopoulos, 2002; Bambico et al., 2007). Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados descritos en el apartado 3.3 de la presente Tesis, que describen un antagonismo cruzado en los heterómeros CB₁R-CB₂R expresados en el cerebro, no se puede descartar la participación de los heterómeros CB₁R-CB₂R receptores de serotonina.

El hecho de que, evolutivamente hablando, los distintos sistemas de neurotransmisores hayan surgido simultáneamente, ha permitido la formación de una red de señalización altamente compleja, pero a la vez sincronizada e interrelacionada. Para el caso de los GPCR, su capacidad de formar oligómeros entre distintos receptores evidencia esta versatilidad en sus acciones, dado que las entidades asociativas de las membranas celulares pueden variar ampliamente en sus propiedades farmacológicas y funcionales dependiendo de la composición de los protómeros en los oligómeros. En el sistema nervioso central, se expresan una gran variedad de GPCR y se han encontrado múltiples evidencias de que sus interacciones derivan en una acción conjunta y necesaria para el correcto funcionamiento de los distintos procesos cerebrales. El sistema endocannabinoide es un claro ejemplo de ello, ya que los CB₁R forman parte de diversos oligómeros con funcionalidades diferentes y específicas. En esta tesis, se ha observado que los CB₂R también podrían tener esta capacidad versátil para formar parte de distintas redes de señalización ya que son capaces de formar heterómeros con los receptores de adenosina A_{2A} y de serotonina 5HT_{2C}. Sin embargo, para poder afirmar que los CB₂R participan de esta manera dentro de las redes neuronales *in vivo* sería necesario demostrar que estos heterómeros se expresan, de hecho, en el cerebro. Las técnicas descritas en este Anexo sólo permiten afirmar la interacción molecular entre estos receptores en cultivos celulares, pero dejan puertas sutilmente abiertas hacia futuros estudios de expresión y función de estos heterómeros en el cerebro.

4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resumen de resultados y discusión

Es sabido que los endocannabinoides y sus receptores ejercen una función relevante en una gran variedad de tejidos (Galiègue et al., 1995; Malan et al., 2001; Randall et al., 2002; Gerdeman y Lovinger, 2003; Venance et al., 2004; Maldonado et al., 2006). En el cerebro, los cannabinoides, exógenos o endógenos, modulan procesos como la actividad motora, la memoria, el aprendizaje o el apetito, entre muchos otros, y pueden actuar activando receptores post-sinápticos o, como mensajeros retrógrados dentro de numerosas sinapsis, activando receptores pre-sinápticos (Ameri, 1999; Wilson y Nicoll, 2002; Freund et al., 2003b; Berghuis et al., 2007; Mackie, 2008; Di Marzo, 2011). Hasta el momento, sólo se han caracterizado completamente dos tipos de receptores de tipo cannabinoides, los CB₁R y los CB₂R (Howlett, 2002; Pertwee y Ross, 2002; Mackie, 2008). Los CB₁R están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, mientras que los CB₂R habían sido considerados exclusivamente periféricos, expresados de forma preferencial en el sistema inmune. (Munro et al., 1993; Galiègue et al., 1995; Marsicano y Lutz, 1999). Sin embargo, recientes evidencias experimentales han demostrado la expresión de CB₂R en el cerebro (Van Sickle et al., 2005; Onaivi et al., 2006; Gong et al., 2006; Brusco et al., 2008b; Onaivi et al., 2008), aunque su expresión en neuronas es todavía, a día de hoy, un hecho ciertamente controvertido (Onaivi, 2011). Puesto que la expresión de CB₂R es minoritaria respecto a la expresión de CB₁R en el cerebro, las técnicas de inmunohistoquímica no han llegado a ofrecer suficiente resolución para poder detectarlo. En el primer trabajo presentado en esta Tesis titulado “*Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of Macaca fascicularis*” hemos abordado el análisis de la expresión de los CB₂R, en neuronas de cerebro de primates, utilizando una estrategia distinta, basada en hibridización in situ (ISH) y diseñando sondas altamente específicas para los CB₂R.

A pesar de que ha prevalecido la idea del receptor de cannabinoides de tipo 2 como un receptor de localización exclusivamente periférica, nuestros estudios por PCR e ISH colorimétrica contradicen esta hipótesis y evidencian la existencia de CB₂R en el CNS de primates no humanos. Se ha observado una expresión notable de transcritos de mRNA de CB₂R en el hipocampo, capas piramidales III y V de la corteza cerebral y ambas subdivisiones del globo pálido (GPi y GPe). Además, mediante estudios de co-localización por microscopía confocal, utilizando marcadores neuronales específicos, hemos podido corroborar la identidad neuronal de las células palidales que expresan el

mRNA de CB₂R. Estos resultados concuerdan con los previamente descritos utilizando detección inmunohistoquímica indirecta en roedores (Gong et al., 2006; Brusco et al., 2008b; a). El uso de anticuerpos para demostrar la expresión neuronal de CB₂R en el CNS ha sido, y sigue siendo a día de hoy, materia de controversia, dada la dificultad de encontrar anticuerpos suficientemente específicos como para no unirse a la abundante cantidad de CB₁R en el CNS en relación a la escasa proporción de CB₂R (Onaivi et al., 2006); además, esta controversia se incrementa debido a que los ligandos dirigidos contra el receptor han mostrado una aparente falta de psicoactividad, lo cual se ha considerado como una evidencia de la falta de CB₂R en neuronas. De hecho, Malan y sus colaboradores (Malan et al., 2001) documentaron que las respuestas de dolor eran inhibidas por la activación de los CB₂R sin los efectos piscotrópicos producidos por los agonistas de CB₁R.

En neuronas, hay que considerar las posibles diferencias en cuanto a la localización subcelular de los CB₁R y CB₂R. La localización preferencialmente presináptica de CB₁R, que media la acción inhibitoria de los cannabinoides en la liberación de neurotransmisores, es hoy un hecho comúnmente aceptado, dado que este mecanismo regulador, mediado por cannabinoides, está altamente conservado en distintas sinapsis dentro del CNS, como las correspondientes al glutamato (Shen et al., 1996), la acetilcolina (Gifford et al., 1997), la noradrenalina (Schlicker et al., 1997b) y el GABA (Katona et al., 1999). Sin embargo, también se ha podido determinar la presencia de CB₁R en dendritas, donde ejercería un papel post-sináptico (Pickel et al., 2004). Con respecto al CB₂R, se ha sugerido una localización preferencialmente post-sináptica (Gong et al., 2006; Brusco et al., 2008a; b), aunque es posible que pueda existir también de manera pre-sináptica, puesto que se ha llegado a determinar la expresión de CB₂R en los axones amielinizados de la sustancia nigra, sin que estos receptores se lleguen a encontrar en terminales axónicos (Brusco et al., 2008a). A partir de nuestros datos, no podemos concluir si la distribución de los CB₂R es pre- o post-sináptica, ya que se han obtenido a partir de procedimientos de ISH que detectan mRNA y no proteína, pero sí se pueden establecer varias hipótesis en cuanto al posible destino de los transcritos de CB₂R sintetizados: i) ser transportados de manera anterógrada hacia los axones terminales distales (lo que sugiere una distribución pre-sináptica), (ii) permanecer en proximidad al lugar de síntesis para ser incorporados después a la

4. Resumen de resultados y discusión

membrana plasmática del cuerpo celular y las dendritas (lo cual indicaría una distribución post-sináptica) o (iii) una combinación de esas dos posibilidades. La determinación de la localización subcelular del receptor, dentro de las diferentes sinapsis neuronales, es importante para tratar de discernir cuál es el papel de los CB₂R en el sistema nervioso central y si su señalización cambia igualmente con su localización.

Independientemente de su localización subcelular, la expresión de los CB₂R en las neuronas palidales abre nuevas perspectivas para el uso de cannabinoides en el tratamiento de alteraciones dentro de los ganglios basales y, especialmente, en aquellas alteraciones motoras que implican circuitos donde las neuronas palidales juegan un papel fundamental. Con frecuencia, se han propuesto a los CB₂R como posibles dianas farmacológicas durante los procesos inflamatorios o citotóxicos, procesos que están involucrados en la evolución de las enfermedades neurodegenerativas (Fernández-Ruiz et al., 2008). Esto es así ya que el receptor no sólo se expresa en células microgliales sanas, sino que su expresión se encuentra incrementada en condiciones patológicas, (revisado Ashton y Glass, 2007) y su activación, mediada por cannabinoides, ha dado lugar a neuroprotección en ratas modelo de la enfermedad del Parkinson (García-Arencibia et al., 2007). El descubrimiento de la expresión de los CB₂R en las neuronas palidales abre nuevas perspectivas para el uso potencial de los cannabinoides en el tratamiento de los desórdenes de los ganglios basales.

Las neuronas del GPi constituyen la salida de los ganglios basales hacia el tálamo. De acuerdo con el modelo de circuitos en los ganglios basales (Albin et al., 1989; Crossman, 1987; DeLong, 1990), las proyecciones de las neuronas GABAérgicas palidotálámicas se vuelven hiperactivas tras la eliminación de dopamina, produciendo más inhibición en las áreas talámicas que son receptoras de las neuronas eferentes del GPi. Esta hiperactividad está sustentada por dos mecanismos sinérgicos: Por un lado, en ausencia de dopamina, las neuronas del GPi reciben menor cantidad de GABA, proveniente de las neuronas de proyección estriatopalidales, estando, por tanto, menos inhibidas. Por otro lado, las neuronas del GPi reciben una cantidad mayor de glutamato desde las neuronas subtalámicas hiperactivas, esto es, más excitación. En este contexto, el efecto potencial de agonistas y antagonistas de los CB₂R dependería, principalmente, de la localización pre- o post-sináptica de los mismos. Asumiendo que los CB₂R se

comportan de la misma manera que los CB₁R pre-sinápticos, los agonistas de los CB₂R podrían restablecer las condiciones basales en los ganglios basales. En este sentido, hay que tener en cuenta el papel que se ha propuesto para el sistema endocannabinoide en la patofisiología de las disquinesias inducidas por levodopa (Ferrer et al., 2003). De hecho, se ha visto que es posible atenuar las disquinesias inducidas por levodopa mediante el tratamiento con rimonabant, antagonista que bloquea los CB₁R, pero también a CB₂R en altas dosis (Pertwee, 1999). Finalmente, si los CB₂R se localizan post-sinápticamente, su acción podría ser más compleja y depender, no sólo de su actividad individual (a día de hoy todavía desconocida), sino de las posibles interacciones con otros receptores en la membrana postsináptica.

Una vez demostrada la expresión de CB₂R en neuronas del CNS, nos planteamos investigar dos cuestiones. En primer lugar, determinar alguna funcionalidad para los CB₂R neuronales y, en segundo lugar, determinar si existe alguna interrelación entre los CB₁R y los CB₂R. Respecto a la primera cuestión, dado que es difícil conjeturar cuál podría ser el papel fisiológico de un receptor que se expresa de manera minoritaria en el cerebro, como los CB₂R, se hacía necesario encontrar algún modelo *in vivo* que permitiera dilucidar algunos aspectos relevantes sobre la funcionalidad de los CB₂R en el sistema nervioso. En este contexto, en el segundo trabajo presentado en esta Tesis titulado “*Overexpression of cannabinoid receptor CB₂ mRNA impairs cranial nerve development in Xenopus laevis embryos*”, estudiamos el papel de los CB₂R durante el desarrollo del sistema nervioso en el modelo embrionario de *Xenopus laevis*. La implicación de los CB₁R en numerosos procesos cognitivos y de regulación neuronal no resulta extraña, en tanto que representan la mayor fracción de receptores de tipo GPCR en el CNS. De hecho, en cuanto al desarrollo neuronal, se han visto implicados en el control de la homeostasis y la supervivencia (Molina-Holgado et al., 2002; Harkany et al., 2007; Marsicano et al., 2003), pero también en neurogénesis, proliferación y especificación del destino de las neuronas en el cerebro (Wilson y Nicoll, 2002; Aguado et al., 2007; Berghuis et al., 2007; Trazzi et al., 2010). Los CB₂R neuronales, por el contrario, no han sido tan ampliamente caracterizados, en parte dada la tardía aceptación de su expresión en el cerebro pero también debido a que son menos abundantes en el CNS y, aunque estudios recientes apuntan hacia un posible papel en la proliferación de progenitores neurales y supervivencia neuronal (Fernández-Ruiz et al.,

4. Resumen de resultados y discusión

2007, 2008), su implicación en el desarrollo durante la embriogénesis no ha sido aún descrita. En este trabajo, mediante experimentos de ganancia de función en el embrión de *Xenopus laevis*, utilizado como modelo de desarrollo *in vivo*, hemos puesto de manifiesto tres observaciones con respecto a los CB₂R: 1) la sobreexpresión de CB₂R pero no de CB₁R en los embriones de *Xenopus* provoca una alteración en el desarrollo de los nervios craneales, concretamente de los nervios maxilomandibular (VII), glossofaríngeo (IX) y vagal (X), 2) tanto la expresión de CB₂R como su activación inducen una señalización diferencial, activando la vía de señalización de la Akt e inhibiendo la vía de las MAP kinasas, 3) la expresión de CB₂R induce la sobreexpresión de los genes *fgf8*, *wnt8* y *pax2* que mantienen un estado proliferativo en las células embrionarias progenitoras de la placoda epibranquial.

Las neuronas sensoriales de la cabeza o los nervios craneales se generan a partir de las denominadas placodas craneales, las cuales incluyen las placodas adenohipofisal, olfatoria, de lente, ótica, de línea lateral, profunda/trigeminal y epibranquiales (D'Amico-Martel y Noden, 1983; Ayer-Le Lievre y Le Douarin, 1982). De acuerdo con los diagramas de Schlosser y colaboradores (Schlosser y Ahrens, 2004), la placoda posterior en los embriones de *Xenopus* (trigeminal, ótica, de línea lateral y epibranquial) se subdivide dando lugar a las placodas individuales que la conforman entre los estadios de brote de cola temprano (estadio 21) y tardío (estadio 33/34) aproximadamente (Schlosser y Ahrens, 2004; Pieper et al., 2011). Los resultados obtenidos a partir de ISH con la sonda *XelrD*, en embriones no inyectados, muestran que, en el estadio 32, las neuronas de las placodas posteriores han adquirido un estado diferenciado y están casi completamente formadas, dando lugar a los nervios craneales trigeminal, ótico, y epibranquial. Nuestros resultados muestran que, a pesar de que la expresión de los CB₂R ocurre de manera inespecífica por todo el embrión, da lugar a un fenotipo muy específico que está limitado a una alteración profunda de los nervios craneales maxilomandibular (VII), glossofaríngeo (IX) y vagal (X), emergentes del área de la placoda posterior y a una alteración más leve del nervio trigeminal (V). Dicha alteración de los nervios craneales viene acompañada, además, de cambios en las rutas de señalización. Así, tanto la expresión de los CB₂R como su activación, aumenta la fosforilación de Akt y, al mismo tiempo, disminuye la fosforilación de las ERK 1/2. Puesto que la ruta de las MAPK inducida por FGF es necesaria para mantener la

diferenciación neuronal temprana de las placodas trigeminales (Canning et al., 2008b), la inhibición de la fosforilación de ERK 1/2 por sobreexpresión de los CB₂R, activados por cannabinoides endógenos o por ligandos exógenos, podría alterar la expresión de genes implicados en el desarrollo de la placoda o de los nervios craneales. Además, los cambios morfológicos observados se detectan de manera espacio-temporal durante la regionalización de los nervios craneales posteriores, esto es, entre el estadio 21 y 32, indicando que la expresión de los CB₂R puede conllevar a cambios muy específicos, en unos pocos genes, que ocurren tan solo en ciertos lugares y en un determinado momento del desarrollo del embrión. Dado que, en los vertebrados, todas las placodas craneales tiene un origen común, es decir, provienen de un mismo *primordio panplacoda*, se ha sugerido que todas ellas presentan las mismas rutas de control de la neurogénesis y de los cambios morfogenéticos (NIEUWKOOP, 1963; Nieuwkoop et al., 1985; Torres y Giráldez, 1998; Schlosser, 2002; Baker y Bronner-Fraser, 2001; Schlosser, 2010). Sin embargo, excepto para unos pocos genes como *eyal* y *six1*, que se expresan de manera homogénea en todas las placodas, los patrones moleculares, durante el desarrollo y la especificación de cada placoda, varían de manera espacio-temporal. Schlosser y colaboradores (Schlosser y Ahrens, 2004) fueron pioneros en describir el patrón molecular que se establece durante la regionalización y la especificación de las placodas. De todos los genes que se estudiaron, observaron que, tan sólo los factores *eyal*, *six1* y *six4*, mantenían una expresión uniforme, y que, de alguna manera, éstos estaban implicados en la formación de la placoda genérica. En nuestro modelo, observamos que estos genes (*eyal*, *six1*) no experimentan cambios apreciables en ninguna de las condiciones estudiadas, hecho este que se corresponde con el fenotipo observado, ya que la alteración producida afecta tan sólo a algunos nervios craneales. Otros genes, por el contrario, como es el caso de los factores de transcripción de la familia Pax, se expresan de forma diferente en las distintas placodas durante su inducción y especificación. De esta forma, *pax3* y *pax6* parecen ser los principales protagonistas en la inducción y en la determinación de las placodas trigeminal y profunda respectivamente, mientras que los factores de transcripción *pax2* y *pax8* están circunscritos en el área placodal más posterior que incluye las placodas dorsolateral y epibranchial (Schlosser y Ahrens, 2004). Es importante destacar aquí que, tras el aumento de unos factores de transcripción concretos para la inducción y especificación, la posterior diferenciación requiere la represión subsecuente de los mismos (Torres y

4. Resumen de resultados y discusión

Giráldez, 1998). Por tanto, los genes *pax2* y *pax8*, que se inducen considerablemente en la placoda posterior para dar lugar a sus distintas subdivisiones, se reprimen una vez que cada una de las placodas, ótica y/o epibranchial, han adquirido la especificación y su destino celular. De los factores de transcripción Pax y Sox estudiados en nuestro modelo, tan sólo *pax2* presentaba un aumento de expresión en todas las condiciones de sobreexpresión y activación de los CB₂R, mientras *pax3*, correspondiente a la placoda trigeminal, incrementa su expresión de manera significativa sólo cuando los CB₂R se activaban. En estudios anteriores se había descrito la implicación del factor *pax2*, tanto en la inducción epibranchial como en su bifurcación durante posteriores estadios (Hans et al., 2004, 2; Padanad y Riley, 2011), y cómo es necesaria su inhibición secuencial, en sentido rostro-caudal, para dar lugar a la diferenciación y la correcta regionalización de los nervios glossofaríngeo, maxilomandibular y vagal. Nuestros resultados indican que los CB₂R podrían romper este proceso impidiendo la disminución de *pax2* y, por tanto, induciendo el fenotipo observado.

Los factores *fgf8*, *fgf3* y *wnt8* han sido descritos como posibles inductores de la especificación placodal en varios modelos animales (Phillips et al., 2001; Sun et al., 2007; Nechiporuk et al., 2007; Canning et al., 2008b; Padanad et al., 2012). Nuestros resultados muestran que la expresión de CB₂R es capaz de aumentar la expresión de *wnt8*, lo cual sugiere una modulación de la señal WNT, mientras que el aumento de la expresión de *fgf8* requiere una activación a largo plazo de los CB₂R por su agonista específico JWH133, sugiriendo que también la señal FGF podría ser modulada por el receptor. En el embrión de ratón, la expresión del factor *fgf8* correlaciona con el incremento de expresión de Akt fosforilada (Dubrulle y Pourqui, 2004). Extrapolando este hecho a nuestros resultados, se puede sugerir que el aumento de fosforilación de Akt observado podría ser debido a la señalización de *fgf8*. Sin embargo, dado que los CB₂R también puede señalizar a través de la vía de las Akt (Sánchez et al., 2003; Callen et al., 2012), no podemos descartar la posibilidad de una señalización directa a través del receptor, o al menos, que dicho incremento en la fosforilación de Akt esté mediado por una acción conjunta entre los CB₂R y la señalización de *fgf8*. A pesar de que el factor *fgf3* también se encuentra aumentado cuando los CB₂R están activados, su efecto no resultó ser significativo y, por tanto, no podemos afirmar, aunque tampoco descartar, su posible implicación en nuestro modelo.

En algunos modelos de desarrollo, una señal aumentada de WNT puede bloquear el desarrollo epibranchial (Ohyama et al., 2007) y se cree que el gradiente de la señal de FGF a lo largo del eje antero-posterior es necesario para mantener las células posteriores en estado proliferativo, al mismo tiempo que la diferenciación está teniendo lugar en las partes más anteriores, donde la señalización de FGF ha decaído. De hecho, se ha propuesto que la diferenciación ocurre sólo cuando la expresión de *fgf8* desaparece (Dubrulle y Pourqui, 2004; Lahti et al., 2011, 8), un proceso que los CB₂R pueden interrumpir.

El conjunto de estos resultados indica que tras la expresión y la activación de los CB₂R, se produce un aumento en la señalización de WNT, vía *wnt8*, conjuntamente con la desregulación de *fgf8* que conllevaría la inducción de *pax2*, lo que finalmente produciría el fenotipo observado. Ambos factores, FGF y WNT, se han propuesto como importantes candidatos en los mecanismos de regionalización durante el desarrollo de vertebrados (Gamse y Sive, 2000; Schier, 2001; Kudoh et al., 2002; Stern et al., 2006) y aunque con los datos con los que contamos no podemos predecir cuál de estas señales es la primera en la inducción o inhibición de las siguientes, podemos concluir que la sobreexpresión de CB₂R, a través de la activación en la fosforilación de Akt, la inhibición en la fosforilación de ERK 1/2 y el aumento en la expresión de *fgf8* y *wnt8*, puede mantener el estado proliferativo celular en las placodas epibranchiales con una expresión prolongada de *pax2*. Estos resultados son la primera prueba *in vivo* que pone de manifiesto un papel de los CB₂R en el desarrollo embrionario. Los resultados constituyen, además, una evidencia relevante de que los CB₂R pueden intervenir, a modo de interruptor, en el destino celular, impidiendo el proceso de diferenciación neural de las células embrionarias.

La siguiente cuestión planteada en esta Tesis fue determinar la posible existencia de alguna interrelación funcional entre los CB₁R y los CB₂R. Esta cuestión surgió para dar respuesta a el por qué una misma célula puede requerir de receptores distintos que responden a un mismo neuromodulador. Dado que los CB₁R son muy ubicuos, parece que puedan codistribuir con los CB₂R, por lo que ambos serían candidatos para una posible interacción molecular mediante la cual sean capaces de modularse entre sí. Esta hipótesis ha sido estudiada en el tercer trabajo presentado en esta Tesis, titulado:

4. Resumen de resultados y discusión

“Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in the brain” donde hemos puesto de manifiesto la formación de heterómeros entre CB₁R y CB₂R, en células transfectadas y en distintas áreas del cerebro, y hemos investigado las propiedades farmacológicas y funcionales de este heterómero.

Aunque se ha visto que los CB₁R y CB₂R pueden co-expresarse en las mismas áreas cerebrales (Lanciego et al., 2011; Suárez et al., 2009; Koch et al., 2008; Xi et al., 2011), la relación entre ambos a nivel molecular se desconoce totalmente. Entre los GPCR, existen cada vez más evidencias que apuntan a que la heteromerización entre receptores puede ejercer un papel importante en la regulación de su función (Ferré et al., 2009; Moreno et al., 2011; Fiorentini et al., 2010; Rozenfeld et al., 2011). Sin embargo, la determinación de las características funcionales del heterómero y, principalmente, la identificación de los heterómeros en tejido es, generalmente, un desafío. En este trabajo, hemos presentado diversas evidencias que sugieren la interacción molecular y funcional entre CB₂R y CB₁R. En primer lugar, hemos puesto de manifiesto que CB₁R y CB₂R pueden formar heterómeros tanto en células transfectadas como en tejidos cerebrales que incluyen la glándula pineal, el núcleo accumbens y el globo pálido. En segundo lugar, hemos encontrado que una de las características específicas del heterómero CB₁R-CB₂R es que presenta un cross-antagonismo bidireccional, esto es, los antagonistas de CB₁R tienen la capacidad de bloquear el efecto de los agonistas de CB₂R y, también al contrario, los antagonistas de CB₂R tienen la capacidad para bloquear el efecto de los agonistas de CB₁R. En tercer lugar, la co-activación de los heterómeros CB₁R-CB₂R resulta en un cross-talk negativo en la fosforilación de Akt y el crecimiento de neuritas.

Primeramente, la identificación de los heterómeros CB₁R-CB₂R se llevó a cabo en células cotransfectadas mediante la técnica biofísica de BRET y por inmunofluorescencia, usando ensayos de “proximity ligation assays” o PLA, en un modelo celular neuronal. Un heterómero de receptores es un complejo macromolecular compuesto por al menos dos receptores funcionales. Los heterómeros muestran propiedades diferentes de los receptores individuales en su forma monomérica (Ferré et al., 2009). Para caracterizar funcionalmente el heterómero expresado en células de neuroblastoma, se utilizó la capacidad de ambos receptores de cannabinoides de señalizar a través de las vías de MAP kinasas y Akt/PKB (Molina-Holgado et al., 2002;

Sánchez et al., 2003). En un principio, investigamos si se producía algún cambio en la señalización de Akt/PKB (fosforilación de la Akt en Ser-473) cuando los heterómeros eran co-estimulados con agonistas o bloqueados con antagonistas. Cuando las células de neuroblastoma eran co-estimuladas con los ligandos de ambos receptores, se observó un *cross-talk* negativo entre CB₁R y CB₂R en la fosforilación de Akt/ PKB. Se ha descrito que la activación de la señalización de PI3K/ Akt está implicada en la diferenciación neural de la células SH-SY5Y (López-Carballo et al., 2002); de acuerdo con esto, en este modelo neuronal observamos que los agonistas de CB₁R y CB₂R son capaces de promover la neuritogénesis y se produjo un *cross-talk* negativo en el crecimiento de neuritas cuando las células se co-estimulaban con los agonistas de ambos receptores. Estos resultados sugieren que CB₁R y CB₂R, cuando están presentes en las mismas células, pueden modularse negativamente entre ellos durante la estimulación de distintas rutas de señalización que modulan el desarrollo cerebral o la diferenciación neural (Fernández-Ruiz et al., 2004; Harkany et al., 2007; Mulder et al., 2008). Aunque estos datos de *cross-talk*, conjuntamente con los de BRET y los ensayos de PLA, implican la formación de heterómeros en la modulación de los receptores, no suponen necesariamente una interacción molecular a nivel de membrana entre los mismos, ya que dicho *cross-talk* también podría estar ocurriendo a un nivel inferior de las vías de transducción de señal. Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando sus antagonistas, muestran claramente que los heterómeros CB₁R-CB₂R son las unidades de señalización. Esto es así ya que, por definición, los antagonistas no señalizan y por tanto, el hecho de los antagonistas específicos de CB₁R puedan bloquear específicamente la señalización CB₂R y viceversa, permite descartar la idea de un posible *cross-talk* a nivel intracelular. Una explicación más razonable es que la unión de un antagonista a uno de los receptores en el heterómero CB₁R-CB₂R conlleva un cambio conformacional que inhibe la fosforilación de Akt/PKB o la neuritogénesis promovida por el otro receptor. Este cross-antagonismo está presente, además, de manera bi-direccional.

La cuestión inmediata, que surge a partir de los resultados descritos, es la de si estos heterómeros CB₁R-CB₂R se expresan o no en el cerebro. Para ahondar en esta posibilidad se usaron diferentes aproximaciones. En tanto que el *cross*-antagonismo discutido en el apartado anterior puede considerarse como una característica propia del

4. Resumen de resultados y discusión

heterómero, se utilizó esta característica como huella dactilar para investigar la expresión de los heterómeros CB₁R-CB₂R en el globo pálido, una región encefálica donde previamente hemos descrito la expresión de CB₂R (Lanciego et al., 2011). Dado que, en el globo pálido de rata, CB₁R y CB₂R no se encuentran bien acoplados a la fosforilación de Akt/PKB, se utilizó la señalización a través de MAP kinasas, ya que su activación individual sí aumentaba la fosforilación de ERK 1/2 en los cortes de globo pálido de rata. Para esta ruta de señalización, se observó un claro *cross*-antagonismo que sugiere la expresión de los heterómeros CB₁R-CB₂R en el globo pálido.

Una segunda cuestión en abordar es si los heterómeros CB₁R-CB₂R pueden explicar alguno de los efectos inducidos por cannabinoides descritos anteriormente. Publicaciones recientes han descrito que CB₁R y CB₂R se co-expresan en la glándula pineal y pueden estar implicados en su función (Koch et al., 2008). De hecho, todos los componentes del sistema endocannabinoide, los receptores, pero también las enzimas que catalizan las biosíntesis y degradación de los endocannabinoides, se han podido detectar en pinealocitos. La expresión de los CB₂R permanece invariable durante el ciclo de 12 horas de luz:12 horas de oscuridad, mientras que la inmunodetección de los CB₁R se ve reducida al final del ciclo de luz, cuando la expresión de ambos receptores resulta ser la más balanceada (Koch et al., 2008). Pudimos detectar la expresión de los heterómeros CB₁R-CB₂R, mediante ensayos de PLA, en pinealocitos aislados a partir de glándulas pineales extraídas al final del período de luz. En la glándula pineal, el ritmo de la síntesis de melatonina está bajo el control de la regulación mediada por norepinefrina de la N-acetiltransferasa (AANAT), la penúltima enzima en la regulación de la biosíntesis de melatonina (Klein, 2007), y se ha descrito que los fitocannabinoides, como el tetrahidrocanabinol, reducen la actividad de AANAT disminuyendo la biosíntesis de melatonina en la glándula pineal (Koch et al., 2006). Nuestros resultados, de hecho, avalan esta hipótesis ya que, a través del *cross-talk* negativo en los heterómeros CB₁R-CB₂R, los CB₂R podrían modular negativamente el efecto de tetrahidrocannabinol mediado por CB₁R en la actividad de AANAT, principalmente, al final de periodo de luz y, de este modo, sería capaz de modular la síntesis de melatonina.

Otra región dónde se ha detectado la expresión de los CB₂R es el núcleo accumbens, dónde los CB₂R podrían estar implicados directamente en las propiedades motivacionales y neuroquímicas de la cocaína, responsables de los mecanismos de adicción (Xi et al., 2011). De hecho, los agonistas de CB₂R, inyectados directamente en el núcleo accumbens, disminuyen la toma de cocaína en las ratas; los CB₂R pueden regular las propiedades psicomotoras estimulantes de la cocaína e incluso se ha visto que los CB₂R, que se activan endógenamente por los endocannabinoides en el núcleo accumbens, pueden controlar la actividad locomotora (Xi et al., 2011). Dado que los CB₁R también se expresan en el estriado (Pickel et al., 2006; Martín et al., 2008) y se ha descrito su implicación en el control de la actividad locomotora (Martín et al., 2008), determinamos, mediante ensayos de PLA, la posible expresión del heterómero en cortes de núcleo accumbens de rata y encontramos expresión de los heterómeros CB₁R-CB₂R en esta región cerebral. Aunque los efectos mediados por los CB₂R en la actividad locomotora también se han demostrado previamente en los ratones *CB₁^{-/-}* (Xi et al., 2011), nuestros resultados ponen de manifiesto una nueva propiedad por la que los CB₁R y los CB₂R pueden modularse entre sí para controlar la locomoción a través de los heterómeros, en los que uno de los receptores actuaría como el freno del otro receptor. Dado que, como se ha comentado anteriormente, los CB₁R son mucho más abundantes en neuronas que los CB₂R, los cambios en la expresión de CB₂R podrían ser los responsables de un nuevo nivel de regulación en la función de los CB₁R mediante un mecanismo de alteración en la proporción de los heterómeros CB₁R-CB₂R. No obstante, son necesarios más estudios que prueben la veracidad de esta hipótesis.

En suma, a partir de nuestros datos se pueden explicar algunos de los aspectos controvertidos relacionados con los CB₁R y los CB₂R. Una de estas polémicas es debida al nivel de expresión de ambos receptores en el cerebro. Existen varios trabajos que discuten sobre la cantidad de CB₂R en el cerebro, cuyos niveles puedan cambiar en condiciones patológicas, y especulan sobre el posible papel neuronal de los CB₂R (Benito et al., 2003; Ehrhart et al., 2005; Van Sickle et al., 2005; Gong et al., 2006; Brusco et al., 2008a; b; Onaivi et al., 2008; Sagredo et al., 2009; Lanciego et al., 2011; Fernández-Ruiz et al., 2007; García-Gutiérrez y Manzanares, 2011; Onaivi et al., 2011). Nuestros resultados sugieren que, incluso a niveles de expresión bajos, el papel de los CB₂R sería relevante, ya que podrían inhibir la señalización de los CB₁R en zonas

4. Resumen de resultados y discusión

específicas. Durante los procesos isquémicos, de inflamación o daño celular, esta modulación podría verse incrementada, apoyando así la hipótesis propuesta por Onaivi y sus colaboradores en la que establecen que los CB₁R y los CB₂R podrían trabajar independientemente y/o cooperativamente según las poblaciones neuronales en las que se encuentren (Onaivi, 2011). Nuestros resultados indican, además, que en neuronas que expresan ambos receptores, esta interdependencia podría estar mediada por la formación de heterómeros. Otro punto crucial en el estudio de los receptores de cannabinoides es concerniente a sus ligandos, ya que los niveles bajos o altos de los mismos han dado lugar a diferentes resultados (Bambico et al., 2007; Bellocchio et al., 2010), lo cual se han interpretado ora por que afectan a diferentes poblaciones neuronales ora por su unión a otros receptores capaces de mediar las acciones de los cannabinoides, tales como el TRPV1 o GPR55, en la mismas neuronas. Sin embargo, estos hechos podrían resultar más lógicos si, alternativamente, se explican teniendo en cuenta la posible formación de heterómeros. En este contexto, se observaba un efecto diferencial a altas y bajas dosis del agonista de receptores de cannabinoides no específico WIN55212,2 sobre el sistema serotoninérgico. A bajas dosis se observaba un incremento en la excitación neuronal, mientras a concentraciones altas, dicha excitación se veía disminuida. Los autores han discutido la posibilidad de que estos efectos pueden estar mediados por los CB₁R, ya que utilizando su antagonista específico rimonabant se bloquea esta acción. Sin embargo, nuestros resultados indican que los antagonistas de CB₁R pueden bloquear también la señalización mediada por los CB₂R a través de los heterómeros de estos receptores. Por tanto, sería interesante revisar estos experimentos usando también un antagonista específico de CB₂R y verificando su capacidad de bloqueo. Por otro lado, los heterómeros también pueden ayudar a explicar los efectos, aparentemente opuestos, que se han observado con los dos ligandos endógenos más abundantes, el 2-araquidonoilglicerol y la anandamida, en las neuronas espinosas estriatales y las neuronas sensoriales de la raíz del ganglio dorsal (revisado por Vincenzo di Marzo (Di Marzo, 2011)). Parte de estos efectos podrían ser debidos a la señalización diferencial de los heterómeros. Sin embargo, para poder dilucidar cómo se comportan los heterómeros, en los diferentes tejidos y a diferentes concentraciones de estos dos tipos de endocannabinoides, serían necesarios más estudios.

Recientemente, se ha propuesto un tercer componente en la familia de receptores de cannabinoides, el receptor huérfano GPR55 (Pertwee, 2007, 55; Ryberg et al., 2007, 55) para el que también se ha descrito una interacción funcional con los CB₂R (Balenga et al., 2011; Irving, 2011). Sería interesante poder caracterizar más ampliamente su papel en el cerebro, si lo tiene, y verificar si puede formar también heterómeros con otros miembros de la familia. Para concluir, hemos determinado la presencia de los heterómeros CB₁R-CB₂R en diferentes regiones cerebrales. Estos heterómeros pueden tener un impacto trascendente en la señalización cannabinoide en una gran variedad de sistemas neurológicos e inmunológicos y, así, nuestros datos sugieren que estos heterómeros han de tenerse en cuenta en el diseño de aproximaciones terapéuticas para alteraciones en las que está implicado el sistema endocannabinoide.

Este mecanismo de regulación intrínseca de los receptores, mediante la capacidad de formar heterómeros, puede ocurrir no sólo entre receptores de una misma familia, para regular su expresión y participación en los distintos procesos neuronales, sino también entre receptores de distintos neurotransmisores. De esta manera, dada la alta variabilidad de receptores, podrían constituir una red de señalización altamente sincronizada y estrechamente regulada entre ellos mismos. Este hecho, más allá de deslumbrarnos, cómo habitualmente sucede previa mirada de lo desconocido, no ha de extrañarnos si tenemos en cuenta la complejidad del sistema nervioso. Los oligómeros de los GPCR inmersos en las membranas celulares, son capaces, de hecho, de cambiar las propiedades farmacológicas, de señalización y función, al variar la composición monomérica de los mismos, y suponen una posible explicación, aunque no la única, de las posibles interacciones funcionales observadas entre los distintos sistemas. De hecho, como ya se ha comentado anteriormente, los CB₁R forman parte de diversos oligómeros que tienen una acción diferente en función de su composición (Mackie, 2005). En esta Tesis, en el Anexo 2, se ha demostrado, mediante técnicas de transferencia de energía, que los CB₂R tienen también capacidad para formar parte de esta promiscua red de señalización y son capaces, no sólo de formar homómeros (resultados presentados en el Anexo 1) y formar heterómeros con el receptor de su misma familia, CB₁, sino también con receptores de otras familias como los de adenosina A_{2A} y serotonina 5HT_{2C}. Este hecho puede ser de especial interés para estudiar su implicación en las funciones cognitivas, dado que estos receptores podrían co-expresarse en las mismas neuronas y,

4. Resumen de resultados y discusión

en ese caso, formar heterómeros u oligómeros mediando distinto tipo de función, señalización y regulación.

Para el caso de los heterómeros entre los receptores de adenosina y de cannabinoides, el estriado supone un posible escenario dónde estos heterómeros puedan tener un papel funcional, ya que tanto los A_{2A}R como los CB₁R y CB₂R se encuentran presentes en las neuronas medias espinosas estriatales de rata (Ciruela et al., 2006; Martín et al., 2008; Gong et al., 2006). En este sentido, la actividad motora reguladora ejercida por los CB₁R en el estriado de rata depende de la activación de los A_{2A}R (Carriba et al., 2007). Además, los CB₂R son capaces de mediar los efectos de estimulación locomotora y de recompensa ejercidos por la cocaína en el núcleo accumbens (Xi et al., 2011), mientras en el estriado ventral de rata, la expresión de los A_{2A}R incrementa durante la autoadministración continuada de cocaína (Marcellino et al., 2007). Nuestros resultados en células transfectadas ponen de manifiesto un moderado cross-talk negativo entre ambos receptores en el heterómero A_{2A}R-CB₂R en la formación de neuritas y en la señalización intracelular. Sin embargo, son necesarios experimentos ulteriores que nos permitan tener resultados concluyentes acerca de la funcionalidad *in vivo* de estos heterómeros y su posible expresión en el cerebro.

El conjunto de estos resultados pone de manifiesto, por tanto, la capacidad de los CB₂R para interactuar con distintos tipos de GPCR, una capacidad que abre nuevas perspectivas para comprender el papel de los CB₂R en el cerebro, lo que podría aportar nuevas y más eficaces herramientas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades en las que estén involucrados tanto los cannabinoides como otros neurotransmisores.

5. CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Conclusiones que hacen referencia al **Objetivo 1** de esta Tesis:

1. Se ha logrado obtener una sonda que permite detectar, de manera específica, el mRNA codificante para el CB₂R en distintas áreas de cerebro de *Macaca fascicularis* mediante PCR e ISH colorimétrica.
2. En el cerebro de *Macaca fascicularis*, los CB₂R se expresan en el hipocampo, en las capas piramidales III y V de la corteza cerebral y en el globo pálido, siendo en este último dónde se detecta la mayor expresión.
3. Se ha determinado la identificación neuronal de las células que expresan el mRNA del CB₂R en ambas subdivisiones del complejo palidal, GPi y GPe.

Conclusiones que hacen referencia al **Objetivo 2** de esta Tesis:

4. La sobreexpresión del CB₂R, pero no del CB₁R, impide el correcto desarrollo de los nervios craneales epibranciales, maxilomandibular (VII), glossofaríngeo (IX) y vagal (X), en un modelo *in vivo* del desarrollo neural.
5. El fenotipo aberrante observado en los nervios craneales se correlaciona con un aumento en la fosforilación de Akt/PI3K, una disminución de la fosforilación de ERK 1/2 y una alteración en el gradiente espacio-temporal de la expresión de factores de transcripción determinantes para el desarrollo antero-posterior del sistema nervioso en vertebrados, tales como *fgf8*, *wnt8* y *pax2*.

Conclusiones que hacen referencia a los **Objetivos 3 y 4** de esta Tesis:

6. Los CB₂R se expresan como homómeros en células transfectadas y forman heterómeros con los CB₁R en células transfectadas, en un modelo celular neuronal, y en diversos tejidos encefálicos de rata, como la glándula pineal, el núcleo accumbens y el globo pálido.
7. Una característica bioquímica de los heterómeros CB₁R-CB₂R es que muestran un antagonismo cruzado y bidireccional, mediante el cual, los antagonistas de un receptor inhiben la señalización del otro receptor.
8. La activación de ambos receptores en el heterómero CB₁R-CB₂R da lugar a una interacción negativa en la señalización que ha sido determinada mediante fosforilación de Akt y neuritogénesis en un modelo celular

neuronal. De esta manera, los CB₂R modulan negativamente la función de los CB₁R.

Conclusiones que hacen referencia al **Objetivo 5** de esta Tesis:

9. Además de formar heterómeros con los receptores de su misma familia, los CB₂R son capaces de heteromerizar con otros GPCR tales como los receptores de serotonina 5HT_{2C} o los receptores de adenosina A_{2A}.
10. La coactivación de ambos receptores en los heterómeros A_{2A}R-CB₂R da lugar a una interacción negativa en la fosforilación de ERK 1/2 o en la neuritogénesis de neuroblastomas.

*Adelántate a toda despedida, como si la hubieras
dejado
atrás, como el invierno que se está yendo
pues bajo los inviernos hay uno tan infinitamente
invierno
que, si lo pasas, tu corazón resistirá.
Sé siempre muerto en Eurídice, cantando sube,
ensalzando regresa a la pura relación.
Aquí entre los que se desvanecen, en el reino de lo
que declina,
sé una copa sonora que con sólo sonar se rompió.
Sé, y sabe al mismo tiempo la condición del no-ser
el infinito fondo de tu íntima vibración
para que la lledes a cabo del todo, esta única vez.
A las reservas de la Naturaleza en plenitud, a las
usadas
como a las sordas y mudas, a las indecibles sumas,
añádate jubiloso y aniquila el número.*

Sonetos a Orfeo. R.M. Rilke

6. BIBLIOGRAFÍA

- AbdAlla, S., H. Lothar, y U. Quitterer. 2000. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature*. 407:94–98.
- Abood, M.E. 2005. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 81–115.
- Abramowski, D., M. Rigo, D. Duc, D. Hoyer, y M. Staufenbiel. 1995. Localization of the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor protein in human and rat brain using specific antisera. *Neuropharmacology*. 34:1635–1645.
- Abramowski, D., y M. Staufenbiel. 1995. Identification of the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor as a 60-kDa N-glycosylated protein in choroid plexus and hippocampus. *J. Neurochem*. 65:782–790.
- Aguado, T., A. Carracedo, B. Julien, G. Velasco, G. Milman, R. Mechoulam, L. Alvarez, M. Guzmán, y I. Galve-Roperh. 2007. Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J. Biol. Chem*. 282:6854–6862.
- Ahrens, K., y G. Schlosser. 2005. Tissues and signals involved in the induction of placodal Six1 expression in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol*. 288:40–59.
- Albin, R.L., A.B. Young, y J.B. Penney. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 12:366–375.
- Albizu, L., M.-N. Balestre, C. Breton, J.-P. Pin, M. Manning, B. Mouillac, C. Barberis, y T. Durroux. 2006. Probing the existence of G protein-coupled receptor dimers by positive and negative ligand-dependent cooperative binding. *Mol. Pharmacol*. 70:1783–1791.
- Aman, A., y T. Piotrowski. 2008. Wnt/beta-catenin and Fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression. *Dev. Cell*. 15:749–761.
- Ameri, A. 1999. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol*. 58:315–348.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairret, D. Chelsky, M. Dennis, y M. Bouvier. 2000. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:3684–3689.
- Arch, J.R., y E.A. Newsholme. 1978. The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays Biochem*. 14:82–123.
- Ashton, J.C., y M. Glass. 2007. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*. 5:73–80.
- Aso, E., A. Ozaita, M.-À. Serra, y R. Maldonado. 2011. Genes differentially expressed in CB1 knockout mice: involvement in the depressive-like phenotype. *Eur Neuropsychopharmacol*. 21:11–22.

-
- Aso, E., T. Renoir, G. Mengod, C. Ledent, M. Hamon, R. Maldonado, L. Lanfumey, y O. Valverde. 2009. Lack of CB1 receptor activity impairs serotonergic negative feedback. *J. Neurochem.* 109:935–944.
- Augood, S.J., y P.C. Emson. 1994. Adenosine A2a receptor mRNA is expressed by enkephalin cells but not by somatostatin cells in rat striatum: a co-expression study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 22:204–210.
- Aybar, M.J., y R. Mayor. 2002. Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:452–458.
- Ayer-Le Lievre, C.S., y N.M. Le Douarin. 1982. The early development of cranial sensory ganglia and the potentialities of their component cells studied in quail-chick chimeras. *Dev. Biol.* 94:291–310.
- Bailey, A.P., S. Bhattacharyya, M. Bronner-Fraser, y A. Streit. 2006. Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Dev. Cell.* 11:505–517.
- Bailey, A.P., y A. Streit. 2006. Sensory organs: making and breaking the pre-placodal region. *Curr. Top. Dev. Biol.* 72:167–204.
- Baker, C.V., y M. Bronner-Fraser. 2000. Establishing neuronal identity in vertebrate neurogenic placodes. *Development.* 127:3045–3056.
- Baker, C.V., y M. Bronner-Fraser. 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev. Biol.* 232:1–61.
- Baker, C.V.H., P. O'Neill, y R.B. McCole. 2008. Lateral line, otic and epibranchial placodes: developmental and evolutionary links? *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 310:370–383.
- Baker, D., G. Pryce, G. Giovannoni, y A.J. Thompson. 2003. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol.* 2:291–298.
- Balenga, N.A.B., E. Aflaki, J. Kargl, W. Platzer, R. Schröder, S. Blättermann, E. Kostenis, A.J. Brown, A. Heinemann, y M. Waldhoer. 2011. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res.* 21:1452–1469.
- Bambico, F.R., N. Katz, G. Debonnel, y G. Gobbi. 2007. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 27:11700–11711.
- Barembaum, M., y M. Bronner-Fraser. 2005. Early steps in neural crest specification. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16:642–646.
- Barrington, W.W., K.A. Jacobson, y G.L. Stiles. 1990. Glycoprotein nature of the A2-adenosine receptor binding subunit. *Mol. Pharmacol.* 38:177–183.

- Bate, C.M., y M. Jacobson. 1978. Development of sensory systems. Springer-Verlag. 492 pp.
- Bellocchio, L., P. Lafenêtre, A. Cannich, D. Cota, N. Puente, P. Grandes, F. Chaouloff, P.V. Piazza, y G. Marsicano. 2010. Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat. Neurosci.* 13:281–283.
- Beltramo, M., N. Stella, A. Calignano, S.Y. Lin, A. Makriyannis, y D. Piomelli. 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* 277:1094–1097.
- Benito, C., E. Núñez, R.M. Tolón, E.J. Carrier, A. Rábano, C.J. Hillard, y J. Romero. 2003. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J. Neurosci.* 23:11136–11141.
- Berg, K.A., W.P. Clarke, K.A. Cunningham, y U. Spampinato. 2008. Fine-tuning serotonin_{2c} receptor function in the brain: molecular and functional implications. *Neuropharmacology.* 55:969–976.
- Berg, K.A., S. Maayani, J. Goldfarb, C. Scaramellini, P. Leff, y W.P. Clarke. 1998. Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol. Pharmacol.* 54:94–104.
- Berghuis, P., A.M. Rajnicek, Y.M. Morozov, R.A. Ross, J. Mulder, G.M. Urbán, K. Monory, G. Marsicano, M. Matteoli, A. Canty, A.J. Irving, I. Katona, Y. Yanagawa, P. Rakic, B. Lutz, K. Mackie, y T. Harkany. 2007. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science.* 316:1212–1216.
- Berrendero, F., N. Sepe, J.A. Ramos, V. Di Marzo, y J.J. Fernández-Ruiz. 1999. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse.* 33:181–191.
- Bhattacharyya, S., y M. Bronner-Fraser. 2004. Hierarchy of regulatory events in sensory placode development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14:520–526.
- Biegon, A., y I.A. Kerman. 2001. Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain. *Neuroimage.* 14:1463–1468.
- Bisogno, T., F. Howell, G. Williams, A. Minassi, M.G. Cascio, A. Ligresti, I. Matias, A. Schiano-Moriello, P. Paul, E.-J. Williams, U. Gangadharan, C. Hobbs, V. Di Marzo, y P. Doherty. 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell Biol.* 163:463–468.
- Blázquez, C., A. Carracedo, L. Barrado, P.J. Real, J.L. Fernández-Luna, G. Velasco, M. Malumbres, y M. Guzmán. 2006. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J.* 20:2633–2635.

-
- Borsook, D., y S.E. Hyman. 1995. Proenkephalin gene regulation in the neuroendocrine hypothalamus: a model of gene regulation in the CNS. *Am. J. Physiol.* 269:E393–408.
- Bouaboula, M., L. Bianchini, F.R. McKenzie, J. Pouyssegur, y P. Casellas. 1999. Cannabinoid receptor CB1 activates the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 isoform via Gi-mediated mitogen activated protein kinase signaling transduction pathways. *FEBS Lett.* 449:61–65.
- Bourne, H.R., D.A. Sanders, y F. McCormick. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 349:117–127.
- Bouvier, M. 2001. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:274–286.
- Bracey, M.H., M.A. Hanson, K.R. Masuda, R.C. Stevens, y B.F. Cravatt. 2002. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science.* 298:1793–1796.
- Bramblett, R.D., A.M. Panu, J.A. Ballesteros, y P.H. Reggio. 1995. Construction of a 3D model of the cannabinoid CB1 receptor: determination of helix ends and helix orientation. *Life Sci.* 56:1971–1982.
- Breivogel, C.S., J.M. Lambert, S. Gerfin, J.W. Huffman, y R.K. Razdan. 2008. Sensitivity to delta9-tetrahydrocannabinol is selectively enhanced in beta-arrestin2 ^{-/-} mice. *Behav Pharmacol.* 19:298–307.
- Brown, A.J., y C. Robin Hiley. 2009. Is GPR55 an anandamide receptor? *Vitam. Horm.* 81:111–137.
- Brown, S.M., J. Wager-Miller, y K. Mackie. 2002. Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1576:255–264.
- Brugmann, S.A., y S.A. Moody. 2005. Induction and specification of the vertebrate ectodermal placodes: precursors of the cranial sensory organs. *Biol. Cell.* 97:303–319.
- Brugmann, S.A., P.D. Pandur, K.L. Kenyon, F. Pignoni, y S.A. Moody. 2004. Six1 promotes a placodal fate within the lateral neurogenic ectoderm by functioning as both a transcriptional activator and repressor. *Development.* 131:5871–5881.
- Brusco, A., P. Tagliaferro, T. Saez, y E.S. Onaivi. 2008a. Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse.* 62:944–949.
- Brusco, A., P.A. Tagliaferro, T. Saez, y E.S. Onaivi. 2008b. Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1139:450–457.
- Buckley, N.E., S. Hansson, G. Harta, y E. Mezey. 1998. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience.* 82:1131–1149.

- Burgueño, J., D.J. Blake, M.A. Benson, C.L. Tinsley, C.T. Esapa, E.I. Canela, P. Penela, J. Mallol, F. Mayor Jr, C. Lluís, R. Franco, y F. Ciruela. 2003. The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin. *J. Biol. Chem.* 278:37545–37552.
- Cadas, H., S. Gaillet, M. Beltramo, L. Venance, y D. Piomelli. 1996. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci.* 16:3934–3942.
- Caenazzo, L., M.R. Hoehe, W.T. Hsieh, W.H. Berrettini, T.I. Bonner, y E.S. Gershon. 1991. HindIII identifies a two allele DNA polymorphism of the human cannabinoid receptor gene (CNR). *Nucleic Acids Res.* 19:4798.
- Callen, L., E. Moreno, P. Barroso-Chinea, D. Moreno-Delgado, A. Cortes, J. Mallol, V. Casado, J.L. Lanciego, R. Franco, C. Lluís, E.I. Canela, y P.J. McCormick. 2012. Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in the brain. *The Journal of biological chemistry.*
- Canals, M., E. Angulo, V. Casadó, E.I. Canela, J. Mallol, F. Viñals, W. Staines, B. Tinner, J. Hillion, L. Agnati, K. Fuxe, S. Ferré, C. Lluís, y R. Franco. 2005. Molecular mechanisms involved in the adenosine A and A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. *J. Neurochem.* 92:337–348.
- Canals, M., J. Burgueño, D. Marcellino, N. Cabello, E.I. Canela, J. Mallol, L. Agnati, S. Ferré, M. Bouvier, K. Fuxe, F. Ciruela, C. Lluís, y R. Franco. 2004. Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Neurochem.* 88:726–734.
- Canals, M., D. Marcellino, F. Fanelli, F. Ciruela, P. de Benedetti, S.R. Goldberg, K. Neve, K. Fuxe, L.F. Agnati, A.S. Woods, S. Ferré, C. Lluís, M. Bouvier, y R. Franco. 2003. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* 278:46741–46749.
- Canning, C.A., L. Lee, S.X. Luo, A. Graham, y C.M. Jones. 2008a. Neural tube derived Wnt signals cooperate with FGF signaling in the formation and differentiation of the trigeminal placodes. *Neural Dev.* 3:35.
- Canning, C.A., L. Lee, S.X. Luo, A. Graham, y C.M. Jones. 2008b. Neural tube derived Wnt signals cooperate with FGF signaling in the formation and differentiation of the trigeminal placodes. *Neural Dev.* 3:35.
- Carlisle, S.J., F. Marciano-Cabral, A. Staab, C. Ludwick, y G.A. Cabral. 2002. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int. Immunopharmacol.* 2:69–82.
- Carracedo, A., M. Gironella, M. Lorente, S. Garcia, M. Guzmán, G. Velasco, y J.L. Iovanna. 2006. Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res.* 66:6748–6755.

Carriba, P., G. Navarro, F. Ciruela, S. Ferré, V. Casadó, L. Agnati, A. Cortés, J. Mallol, K. Fuxe, E.I. Canela, C. Lluís, y R. Franco. 2008. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods*. 5:727–733.

Carriba, P., O. Ortiz, K. Patkar, Z. Justinova, J. Stroik, A. Themann, C. Müller, A.S. Woods, B.T. Hope, F. Ciruela, V. Casadó, E.I. Canela, C. Lluís, S.R. Goldberg, R. Moratalla, R. Franco, y S. Ferré. 2007. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology*. 32:2249–2259.

Carrier, E.J., C.S. Kearn, A.J. Barkmeier, N.M. Breese, W. Yang, K. Nithipatikom, S.L. Pfister, W.B. Campbell, y C.J. Hillard. 2004. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* 65:999–1007.

Casadó, V., C. Cantí, J. Mallol, E.I. Canela, C. Lluís, y R. Franco. 1990. Solubilization of A1 adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J. Neurosci. Res.* 26:461–473.

Casadó, V., A. Cortés, F. Ciruela, J. Mallol, S. Ferré, C. Lluís, E.I. Canela, y R. Franco. 2007. Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol. Ther.* 116:343–354.

Casadó, V., C. Ferrada, J. Bonaventura, E. Gracia, J. Mallol, E.I. Canela, C. Lluís, A. Cortés, y R. Franco. 2009. Useful pharmacological parameters for G-protein-coupled receptor homodimers obtained from competition experiments. Agonist-antagonist binding modulation. *Biochem. Pharmacol.* 78:1456–1463.

Castañé, A., E. Valjent, C. Ledent, M. Parmentier, R. Maldonado, y O. Valverde. 2002. Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology*. 43:857–867.

Chevalleyre, V., K.A. Takahashi, y P.E. Castillo. 2006. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 29:37–76.

Chi, N., y J.A. Epstein. 2002. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet.* 18:41–47.

Chin, C.-L., A.E. Tovcimak, V.P. Hradil, T.R. Seifert, P.R. Hollingsworth, P. Chandran, C.Z. Zhu, D. Gauvin, M. Pai, J. Wetter, G.C. Hsieh, P. Honore, J.M. Frost, M.J. Dart, M.D. Meyer, B.B. Yao, B.F. Cox, y G.B. Fox. 2008. Differential effects of cannabinoid receptor agonists on regional brain activity using pharmacological MRI. *Br. J. Pharmacol.* 153:367–379.

Cho, K.W., B. Blumberg, H. Steinbeisser, y E.M. De Robertis. 1991. Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene gooseoid. *Cell*. 67:1111–1120.

- Christen, B., y J.M. Slack. 1997. FGF-8 is associated with anteroposterior patterning and limb regeneration in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 192:455–466.
- Ciruela, F., V. Casadó, R.J. Rodrigues, R. Luján, J. Burgueño, M. Canals, J. Borycz, N. Rebola, S.R. Goldberg, J. Mallol, A. Cortés, E.I. Canela, J.F. López-Giménez, G. Milligan, C. Lluís, R.A. Cunha, S. Ferré, y R. Franco. 2006. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J. Neurosci.* 26:2080–2087.
- Cooke, J.E., y C.B. Moens. 2002. Boundary formation in the hindbrain: Eph only it were simple.. *Trends Neurosci.* 25:260–267.
- Cota, D., G. Marsicano, M. Tschöp, Y. Grübler, C. Flachskamm, M. Schubert, D. Auer, A. Yassouridis, C. Thöne-Reineke, S. Ortman, F. Tomassoni, C. Cervino, E. Nisoli, A.C.E. Linthorst, R. Pasquali, B. Lutz, G.K. Stalla, y U. Pagotto. 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J. Clin. Invest.* 112:423–431.
- Couly, G., S. Creuzet, S. Bennaceur, C. Vincent, y N.M. Le Douarin. 2002. Interactions between Hox-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. *Development.* 129:1061–1073.
- Cravatt, B.F., D.K. Giang, S.P. Mayfield, D.L. Boger, R.A. Lerner, y N.B. Gilula. 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 384:83–87.
- Creuzet, S., G. Couly, y N.M. Le Douarin. 2005. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. *J. Anat.* 207:447–459.
- Crossman, A.R. 1987. Primate models of dyskinesia: the experimental approach to the study of basal ganglia-related involuntary movement disorders. *Neuroscience.* 21:1–40.
- Cussac, D., A. Newman-Tancredi, D. Duqueyroi, V. Pasteau, y M.J. Millan. 2002. Differential activation of Gq/11 and Gi(3) proteins at 5-hydroxytryptamine(2C) receptors revealed by antibody capture assays: influence of receptor reserve and relationship to agonist-directed trafficking. *Mol. Pharmacol.* 62:578–589.
- Cussac, D., I. Rauly-Lestienne, P. Heusler, F. Finana, C. Cathala, S. Bernois, y L. De Vries. 2012. μ -opioid and 5-HT(1A) receptors heterodimerize and show signalling crosstalk via G protein and MAP-kinase pathways. *Cell. Signal.* 24:1648–1657.
- Cvejic, S., y L.A. Devi. 1997. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 272:26959–26964.
- D'Amico-Martel, A., y D.M. Noden. 1983. Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *Am. J. Anat.* 166:445–468.
- Daaka, Y., L.M. Luttrell, S. Ahn, G.J. Della Rocca, S.S. Ferguson, M.G. Caron, y R.J. Lefkowitz. 1998. Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273:685–688.

-
- Dahl, E., H. Koseki, y R. Balling. 1997. Pax genes and organogenesis. *Bioessays*. 19:755–765.
- Daigle, T.L., M.L. Kwok, y K. Mackie. 2008. Regulation of CB1 cannabinoid receptor internalization by a promiscuous phosphorylation-dependent mechanism. *J. Neurochem*. 106:70–82.
- Dambly-Chaudière, C., N. Cubedo, y A. Ghysen. 2007. Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev. Biol.* 7:23.
- Delaune, E., P. Lemaire, y L. Kodjabachian. 2005. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development*. 132:299–310.
- DeLong, M.R. 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13:281–285.
- Derocq, J.M., M. Ségui, J. Marchand, G. Le Fur, y P. Casellas. 1995. Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations. *FEBS Lett.* 369:177–182.
- De Deurwaerdère, P., S. Navailles, K.A. Berg, W.P. Clarke, y U. Spampinato. 2004. Constitutive activity of the serotonin_{2C} receptor inhibits in vivo dopamine release in the rat striatum and nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 24:3235–3241.
- Devane, W.A., L. Hanus, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, y R. Mechoulam. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258:1946–1949.
- Devlin, M.G., y A. Christopoulos. 2002. Modulation of cannabinoid agonist binding by 5-HT in the rat cerebellum. *J. Neurochem.* 80:1095–1102.
- Dickason-Chesterfield, A.K., S.R. Kidd, S.A. Moore, J.M. Schaus, B. Liu, G.G. Nomikos, y C.C. Felder. 2006. Pharmacological characterization of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26:407–423.
- Le Douarin, N.M., J.M. Brito, y S. Creuzet. 2007. Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Res Rev.* 55:237–247.
- Dubrulle, J., y O. Pourqui. 2004. fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature*. 427:419–422.
- Durroux, T. 2005. Principles: a model for the allosteric interactions between ligand binding sites within a dimeric GPCR. *Trends Pharmacol. Sci.* 26:376–384.
- Ehret, M., P. Pevet, y M. Maitre. 1991. Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J. Neurochem.* 57:1516–1521.

- Ehrhart, J., D. Obregon, T. Mori, H. Hou, N. Sun, Y. Bai, T. Klein, F. Fernandez, J. Tan, y R.D. Shytle. 2005. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation*. 2:29.
- Eljaschewitsch, E., A. Witting, C. Mawrin, T. Lee, P.M. Schmidt, S. Wolf, H. Hoertnagl, C.S. Raine, R. Schneider-Stock, R. Nitsch, y O. Ullrich. 2006. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron*. 49:67–79.
- Ellis, J., J.D. Padiani, M. Canals, S. Milasta, y G. Milligan. 2006. Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J. Biol. Chem*. 281:38812–38824.
- Encinas, M., M. Iglesias, Y. Liu, H. Wang, A. Muhaisen, V. Ceña, C. Gallego, y J.X. Comella. 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J. Neurochem*. 75:991–1003.
- Farquhar-Smith, W.P., M. Egertová, E.J. Bradbury, S.B. McMahon, A.S. Rice, y M.R. Elphick. 2000. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol. Cell. Neurosci*. 15:510–521.
- Fernández-Ruiz, J., F. Berrendero, M.L. Hernández, y J.A. Ramos. 2000. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci*. 23:14–20.
- Fernández-Ruiz, J., M. Gómez, M. Hernández, R. de Miguel, y J.A. Ramos. 2004. Cannabinoids and gene expression during brain development. *Neurotox Res*. 6:389–401.
- Fernández-Ruiz, J., y S. Gonzáles. 2005. Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handb Exp Pharmacol*. 479–507.
- Fernández-Ruiz, J., M.R. Pazos, M. García-Arencibia, O. Sagredo, y J.A. Ramos. 2008. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol. Cell. Endocrinol*. 286:S91–96.
- Fernández-Ruiz, J., J. Romero, G. Velasco, R.M. Tolón, J.A. Ramos, y M. Guzmán. 2007. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci*. 28:39–45.
- Ferré, S. 2007. Heteromerization of G-protein-coupled receptors. Implications for central nervous system function and dysfunction. *ScientificWorldJournal*. 7:46–47.
- Ferré, S., R. Baler, M. Bouvier, M.G. Caron, L.A. Devi, T. Durrux, K. Fuxe, S.R. George, J.A. Javitch, M.J. Lohse, K. Mackie, G. Milligan, K.D.G. Pflieger, J.-P. Pin, N.D. Volkow, M. Waldhoer, A.S. Woods, y R. Franco. 2009. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat. Chem. Biol*. 5:131–134.
- Ferrer, B., N. Asbrock, S. Kathuria, D. Piomelli, y A. Giuffrida. 2003. Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur. J. Neurosci*. 18:1607–1614.

-
- Fink, J.S., D.R. Weaver, S.A. Rivkees, R.A. Peterfreund, A.E. Pollack, E.M. Adler, y S.M. Reppert. 1992. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 14:186–195.
- Fiorentini, C., C. Busi, P. Spano, y C. Missale. 2010. Dimerization of dopamine D1 and D3 receptors in the regulation of striatal function. *Curr Opin Pharmacol.* 10:87–92.
- Fisher, M.N., y E.A. Newsholme. 1984. Properties of rat heart adenosine kinase. *Biochem. J.* 221:521–528.
- Foley, A.C., I. Skromne, y C.D. Stern. 2000. Reconciling different models of forebrain induction and patterning: a dual role for the hypoblast. *Development.* 127:3839–3854.
- Franco, R., M. Canals, D. Marcellino, S. Ferré, L. Agnati, J. Mallol, V. Casadó, F. Ciruela, K. Fuxe, C. Lluis, y E.I. Canela. 2003. Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering. *Trends Biochem. Sci.* 28:238–243.
- Franco, R., V. Casadó, A. Cortés, C. Ferrada, J. Mallol, A. Woods, C. Lluis, E.I. Canela, y S. Ferré. 2007. Basic concepts in G-protein-coupled receptor homo- and heterodimerization. *ScientificWorldJournal.* 7:48–57.
- Franco, R., V. Casadó, A. Cortés, J. Mallol, F. Ciruela, S. Ferré, C. Lluis, y E.I. Canela. 2008. G-protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1:S90–98.
- Franco, R., V. Casadó, J. Mallol, C. Ferrada, S. Ferré, K. Fuxe, A. Cortés, F. Ciruela, C. Lluis, y E.I. Canela. 2006. The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol. Pharmacol.* 69:1905–1912.
- Franco, R., V. Casadó, J. Mallol, S. Ferré, K. Fuxe, A. Cortés, F. Ciruela, C. Lluis, y E.I. Canela. 2005. Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors. *Trends Biochem. Sci.* 30:360–366.
- Franco, R., A. Valenzuela, C. Lluis, y J. Blanco. 1998. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol. Rev.* 161:27–42.
- Fredholm, B.B., M.P. Abbracchio, G. Burnstock, J.W. Daly, T.K. Harden, K.A. Jacobson, P. Leff, y M. Williams. 1994. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46:143–156.
- Fredholm, B.B., R.A. Cunha, y P. Svenningsson. 2003. Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr Top Med Chem.* 3:413–426.
- Fredriksson, R., M.C. Lagerström, L.-G. Lundin, y H.B. Schiöth. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63:1256–1272.
- Freund, T.F., I. Katona, y D. Piomelli. 2003a. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83:1017–1066.

- Freund, T.F., I. Katona, y D. Piomelli. 2003b. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83:1017–1066.
- Fride, E. 2008. Multiple roles for the endocannabinoid system during the earliest stages of life: pre- and postnatal development. *J. Neuroendocrinol.* 20 Suppl 1:75–81.
- Furuta, Y., y B.L. Hogan. 1998. BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev.* 12:3764–3775.
- Galiègue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussosoy, D. Carrière, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur, y P. Casellas. 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232:54–61.
- Gamse, J., y H. Sive. 2000. Vertebrate anteroposterior patterning: the *Xenopus* neurectoderm as a paradigm. *Bioessays.* 22:976–986.
- Gandia, J., J. Galino, O.B. Amaral, A. Soriano, C. Lluís, R. Franco, y F. Ciruela. 2008. Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett.* 582:2979–2984.
- Gaoni, Y., y R. Mechoulam. 1971. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 93:217–224.
- García-Arencibia, M., S. González, E. de Lago, J.A. Ramos, R. Mechoulam, y J. Fernández-Ruiz. 2007. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res.* 1134:162–170.
- García-Gutiérrez, M.S., y J. Manzanares. 2011. Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J. Psychopharmacol. (Oxford).* 25:111–120.
- Gehring, W.J., y K. Ieko. 1999. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* 15:371–377.
- George, S.R., B.F. O'Dowd, y S.P. Lee. 2002. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 1:808–820.
- Gerdeman, G.L., y D.M. Lovinger. 2003. Emerging roles for endocannabinoids in long-term synaptic plasticity. *Br. J. Pharmacol.* 140:781–789.
- Gershon, M.D. 1999. The enteric nervous system: a second brain. *Hosp Pract (Minneap).* 34:31–32, 35–38, 41–42 passim.
- Gertsch, J., R. Schoop, U. Kuenzle, y A. Suter. 2004. Echinacea alkylamides modulate TNF-alpha gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Lett.* 577:563–569.

Gifford, A.N., Y. Tang, S.J. Gatley, N.D. Volkow, R. Lan, y A. Makriyannis. 1997. Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices. *Neurosci. Lett.* 238:84–86.

Gilbert, S.F. 2005. *Biología del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana. 912 pp.

Giuffrida, A., L.H. Parsons, T.M. Kerr, F. Rodríguez de Fonseca, M. Navarro, y D. Piomelli. 1999. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat. Neurosci.* 2:358–363.

Glass, M., M. Dragunow, y R.L. Faull. 1997. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience.* 77:299–318.

Glass, M., R.L. Faull, y M. Dragunow. 1993. Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. *Neuroscience.* 56:523–527.

Glass, M., y C.C. Felder. 1997. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J. Neurosci.* 17:5327–5333.

Gobbi, G., F.R. Bambico, R. Mangieri, M. Bortolato, P. Campolongo, M. Solinas, T. Cassano, M.G. Morgese, G. Debonnel, A. Duranti, A. Tontini, G. Tarzia, M. Mor, V. Trezza, S.R. Goldberg, V. Cuomo, y D. Piomelli. 2005. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:18620–18625.

Gobert, A., J.M. Rivet, F. Lejeune, A. Newman-Tancredi, A. Adhumeau-Auclair, J.P. Nicolas, L. Cistarelli, C. Melon, y M.J. Millan. 2000. Serotonin(2C) receptors tonically suppress the activity of mesocortical dopaminergic and adrenergic, but not serotonergic, pathways: a combined dialysis and electrophysiological analysis in the rat. *Synapse.* 36:205–221.

Goncalves, M.B., P. Suetterlin, P. Yip, F. Molina-Holgado, D.J. Walker, M.J. Oudin, M.P. Zentar, S. Pollard, R.J. Yáñez-Muñoz, G. Williams, F.S. Walsh, M.N. Pangalos, y P. Doherty. 2008. A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner. *Mol. Cell. Neurosci.* 38:526–536.

Gong, J.-P., E.S. Onaivi, H. Ishiguro, Q.-R. Liu, P.A. Tagliaferro, A. Brusco, y G.R. Uhl. 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 1071:10–23.

Gouldson, P.R., C. Higgs, R.E. Smith, M.K. Dean, G.V. Gkoutos, y C.A. Reynolds. 2000. Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology.* 23:S60–77.

Graham, E.S., N. Ball, E.L. Scotter, P. Narayan, M. Dragunow, y M. Glass. 2006. Induction of Krox-24 by endogenous cannabinoid type 1 receptors in Neuro2A cells is mediated by the MEK-ERK MAPK pathway and is suppressed by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 281:29085–29095.

6. Bibliografía

- Griffin, G., E.J. Wray, Q. Tao, S.D. McAllister, W.K. Rorrer, M.M. Aung, B.R. Martin, y M.E. Abood. 1999. Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 377:117–125.
- Gudermann, T., F. Kalkbrenner, E. Dippel, K.L. Laugwitz, y G. Schultz. 1997. Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 31:253–262.
- Guzmán, M. 2003. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer.* 3:745–755.
- Hans, S., D. Liu, y M. Westerfield. 2004. Pax8 and Pax2a function synergistically in otic specification, downstream of the Foxi1 and Dlx3b transcription factors. *Development.* 131:5091–5102.
- Hans, S., y M. Westerfield. 2007. Changes in retinoic acid signaling alter otic patterning. *Development.* 134:2449–2458.
- Hanus, L., S. Abu-Lafi, E. Fride, A. Breuer, Z. Vogel, D.E. Shalev, I. Kustanovich, y R. Mechoulam. 2001. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:3662–3665.
- Hanus, L., A. Breuer, S. Tchilibon, S. Shiloah, D. Goldenberg, M. Horowitz, R.G. Pertwee, R.A. Ross, R. Mechoulam, y E. Fride. 1999. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:14228–14233.
- Harkany, T., M. Guzmán, I. Galve-Roperh, P. Berghuis, L.A. Devi, y K. Mackie. 2007. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol. Sci.* 28:83–92.
- Hasegawa, H., y A. Ichiyama. 1987. Tryptophan 5-monooxygenase from mouse mastocytoma: high-performance liquid chromatography assay. *Meth. Enzymol.* 142:88–92.
- Hashimoto-dani, Y., T. Ohno-Shosaku, y M. Kano. 2007. Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J. Neurosci.* 27:1211–1219.
- Hashimoto-dani, Y., T. Ohno-Shosaku, T. Maejima, K. Fukami, y M. Kano. 2008. Pharmacological evidence for the involvement of diacylglycerol lipase in depolarization-induced endocannabinoid release. *Neuropharmacology.* 54:58–67.
- Hebert, T.E., S. Moffett, J.P. Morello, T.P. Loisel, D.G. Bichet, C. Barret, y M. Bouvier. 1996. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.* 271:16384–16392.
- Hensey, C., y J. Gautier. 1998. Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev. Biol.* 203:36–48.

-
- Hepler, J.R., y A.G. Gilman. 1992. G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17:383–387.
- Herkenham, M., B.G. Groen, A.B. Lynn, B.R. De Costa, y E.K. Richfield. 1991a. Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum. *Brain Res.* 552:301–310.
- Herkenham, M., A.B. Lynn, B.R. de Costa, y E.K. Richfield. 1991b. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res.* 547:267–274.
- Herkenham, M., A.B. Lynn, M.R. Johnson, L.S. Melvin, B.R. de Costa, y K.C. Rice. 1991c. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11:563–583.
- Herkenham, M., A.B. Lynn, M.D. Little, M.R. Johnson, L.S. Melvin, B.R. de Costa, y K.C. Rice. 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:1932–1936.
- Hermann, H., G. Marsicano, y B. Lutz. 2002. Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience.* 109:451–460.
- Herrick-Davis, K., E. Grinde, y J.E. Mazurkiewicz. 2004. Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry.* 43:13963–13971.
- Higuchi, E., A. Nishi, H. Higashi, Y. Ito, y H. Kato. 2000. Phosphorylation of protein phosphatase-1 inhibitors, inhibitor-1 and DARPP-32, in renal medulla. *Eur. J. Pharmacol.* 408:107–116.
- Hoehe, M.R., L. Caenazzo, M.M. Martinez, W.T. Hsieh, W.S. Modi, E.S. Gershon, y T.I. Bonner. 1991. Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol.* 3:880–885.
- Hohmann, A.G., y M. Herkenham. 1999. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience.* 92:1171–1175.
- Hojo, M., Y. Sudo, Y. Ando, K. Minami, M. Takada, T. Matsubara, M. Kanaide, K. Taniyama, K. Sumikawa, y Y. Uezono. 2008. mu-Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J. Pharmacol. Sci.* 108:308–319.
- Hong, C.-S., B.-Y. Park, y J.-P. Saint-Jeannet. 2008. Fgf8a induces neural crest indirectly through the activation of Wnt8 in the paraxial mesoderm. *Development.* 135:3903–3910.
- Hong, C.-S., y J.-P. Saint-Jeannet. 2007. The activity of Pax3 and Zic1 regulates three distinct cell fates at the neural plate border. *Mol. Biol. Cell.* 18:2192–2202.
- Howlett, A.C. 1985. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 27:429–436.

6. Bibliografía

- Howlett, A.C. 2002. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:619–631.
- Howlett, A.C., M. Bidaut-Russell, W.A. Devane, L.S. Melvin, M.R. Johnson, y M. Herkenham. 1990. The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends Neurosci.* 13:420–423.
- Howlett, A.C., y R.M. Fleming. 1984. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 26:532–538.
- Howlett, A.C., y S. Mukhopadhyay. 2000. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Phys. Lipids.* 108:53–70.
- Howlett, A.C., J.M. Qualy, y L.L. Khachatrian. 1986. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol. Pharmacol.* 29:307–313.
- Hoyer, D., D.E. Clarke, J.R. Fozard, P.R. Hartig, G.R. Martin, E.J. Mylecharane, P.R. Saxena, y P.P. Humphrey. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46:157–203.
- Hoyer, D., y G. Martin. 1997. 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology.* 36:419–428.
- Hsieh, C., S. Brown, C. Derleth, y K. Mackie. 1999. Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Neurochem.* 73:493–501.
- Huang, S.M., y J.M. Walker. 2006. Enhancement of spontaneous and heat-evoked activity in spinal nociceptive neurons by the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyldopamine (NADA). *J. Neurophysiol.* 95:1207–1212.
- Huang, X., y J.-P. Saint-Jeannet. 2004. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Dev. Biol.* 275:1–11.
- Huffman, J.W. 2005. CB2 receptor ligands. *Mini Rev Med Chem.* 5:641–649.
- Irving, A. 2011. New blood brothers: the GPR55 and CB(2) partnership. *Cell Res.* 21:1391–1392.
- Ishiguro, H., S. Iwasaki, L. Teasenzitz, S. Higuchi, Y. Horiuchi, T. Saito, T. Arinami, y E.S. Onaivi. 2007. Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. *Pharmacogenomics J.* 7:380–385.
- Iulianella, A., y P.A. Trainor. 2003. Hox gene control of neural crest cell, pharyngeal arch and craniofacial patterning" >Hox gene control of neural crest cell, pharyngeal arch and craniofacial patterning. *En Murine Homeobox Gene Control of Embryonic Patterning and Organogenesis.* Elsevier. 155–206.
- Iversen, L., y V. Chapman. 2002. Cannabinoids: a real prospect for pain relief? *Curr Opin Pharmacol.* 2:50–55.

Jacoby, E. 2006. Designing compound libraries targeting GPCRs. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 93–103.

Jares-Erijman, E.A., y T.M. Jovin. 2003. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* 21:1387–1395.

Jarrahian, A., V.J. Watts, y E.L. Barker. 2004. D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308:880–886.

Jarvis, M.F., y M. Williams. 1989. Direct autoradiographic localization of adenosine A2 receptors in the rat brain using the A2-selective agonist, [3H]CGS 21680. *Eur. J. Pharmacol.* 168:243–246.

Jenner, P. 2005. Istradefylline, a novel adenosine A2A receptor antagonist, for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 14:729–738.

Jiang, W., Y. Zhang, L. Xiao, J. Van Cleemput, S.-P. Ji, G. Bai, y X. Zhang. 2005. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J. Clin. Invest.* 115:3104–3116.

Jin, W., S. Brown, J.P. Roche, C. Hsieh, J.P. Celver, A. Koo, C. Chavkin, y K. Mackie. 1999. Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J. Neurosci.* 19:3773–3780.

Johnson, G.B., y P.H. Raven. 2002. *Biology: Principles & Explorations.* Houghton Mifflin School. 1096 pp.

Jordan, B.A., y L.A. Devi. 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature.* 399:697–700.

Jordan, B.A., N. Trapaidze, I. Gomes, R. Nivarthi, y L.A. Devi. 2001. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:343–348.

Katona, I., y T.F. Freund. 2008. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* 14:923–930.

Katona, I., B. Sperl agh, A. S ik, A. K afalvi, E.S. Vizi, K. Mackie, y T.F. Freund. 1999. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 19:4544–4558.

Kawakami, K., S. Sato, H. Ozaki, y K. Ikeda. 2000. Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays.* 22:616–626.

Kearn, C.S., K. Blake-Palmer, E. Daniel, K. Mackie, y M. Glass. 2005. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol. Pharmacol.* 67:1697–1704.

Kempe, K., F.F. Hsu, A. Bohrer, y J. Turk. 1996. Isotope dilution mass spectrometric measurements indicate that arachidonylethanolamide, the proposed endogenous ligand

- of the cannabinoid receptor, accumulates in rat brain tissue post mortem but is contained at low levels in or is absent from fresh tissue. *J. Biol. Chem.* 271:17287–17295.
- Kim, D.Y., y M. Camilleri. 2000. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am. J. Gastroenterol.* 95:2698–2709.
- Klein, D.C. 2007. Arylalkylamine N-acetyltransferase: «the Timezyme». *J. Biol. Chem.* 282:4233–4237.
- Knecht, A.K., y M. Bronner-Fraser. 2002. Induction of the neural crest: a multigene process. *Nature Reviews Genetics.* 3:453–461.
- Koch, M., F. Dehghani, I. Habazettl, C. Schomerus, y H.-W. Korf. 2006. Cannabinoids attenuate norepinephrine-induced melatonin biosynthesis in the rat pineal gland by reducing arylalkylamine N-acetyltransferase activity without involvement of cannabinoid receptors. *J. Neurochem.* 98:267–278.
- Koch, M., I. Habazettl, F. Dehghani, y H.-W. Korf. 2008. The rat pineal gland comprises an endocannabinoid system. *J. Pineal Res.* 45:351–360.
- Köfalvi, A., R.J. Rodrigues, C. Ledent, K. Mackie, E.S. Vizi, R.A. Cunha, y B. Sperlágh. 2005. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J. Neurosci.* 25:2874–2884.
- Kolakowski, L.F., Jr. 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept. Channels.* 2:1–7.
- Kouznetsova, M., B. Kelley, M. Shen, y S.A. Thayer. 2002. Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between rat hippocampal neurons in culture. *Mol. Pharmacol.* 61:477–485.
- Kozak, K.R., B.C. Crews, J.D. Morrow, L.-H. Wang, Y.H. Ma, R. Weinander, P.-J. Jakobsson, y L.J. Marnett. 2002. Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. *J. Biol. Chem.* 277:44877–44885.
- Kozak, K.R., J.J. Prusakiewicz, y L.J. Marnett. 2004. Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Curr. Pharm. Des.* 10:659–667.
- Kozak, K.R., J.J. Prusakiewicz, S.W. Rowlinson, D.R. Prudhomme, y L.J. Marnett. 2003. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid anandamide. *Biochemistry.* 42:9041–9049.
- Kozak, K.R., J.J. Prusakiewicz, S.W. Rowlinson, C. Schneider, y L.J. Marnett. 2001. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol. *J. Biol. Chem.* 276:30072–30077.

-
- Kozak, K.R., S.W. Rowlinson, y L.J. Marnett. 2000. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 275:33744–33749.
- Krumlauf, R., H. Marshall, M. Studer, S. Nonchev, M.H. Sham, y A. Lumsden. 1993. Hox homeobox genes and regionalisation of the nervous system. *J. Neurobiol.* 24:1328–1340.
- Kudoh, T., M.L. Concha, C. Houart, I.B. Dawid, y S.W. Wilson. 2004. Combinatorial Fgf and Bmp signalling patterns the gastrula ectoderm into prospective neural and epidermal domains. *Development.* 131:3581–3592.
- Kudoh, T., S.W. Wilson, y I.B. Dawid. 2002. Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development.* 129:4335–4346.
- Kull, B., G. Arslan, C. Nilsson, C. Owman, A. Lorenzen, U. Schwabe, y B.B. Fredholm. 1999. Differences in the order of potency for agonists but not antagonists at human and rat adenosine A2A receptors. *Biochem. Pharmacol.* 57:65–75.
- Kull, B., P. Svenningsson, y B.B. Fredholm. 2000. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* 58:771–777.
- Ladher, R.K., K.U. Anakwe, A.L. Gurney, G.C. Schoenwolf, y P.H. Francis-West. 2000. Identification of synergistic signals initiating inner ear development. *Science.* 290:1965–1967.
- Ladher, R.K., P. O’Neill, y J. Begbie. 2010. From shared lineage to distinct functions: the development of the inner ear and epibranchial placodes. *Development.* 137:1777–1785.
- Ladher, R.K., T.J. Wright, A.M. Moon, S.L. Mansour, y G.C. Schoenwolf. 2005. FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse. *Genes Dev.* 19:603–613.
- Lahti, L., J. Saarimäki-Vire, H. Rita, y J. Partanen. 2011. FGF signaling gradient maintains symmetrical proliferative divisions of midbrain neuronal progenitors. *Developmental Biology.* 349:270–282.
- Lam, P.M.W., J. McDonald, y D.G. Lambert. 2005. Characterization and comparison of recombinant human and rat TRPV1 receptors: effects of exo- and endocannabinoids. *Br J Anaesth.* 94:649–656.
- Lanciego, J.L., P. Barroso-Chinea, A.J. Rico, L. Conte-Perales, L. Callén, E. Roda, V. Gómez-Bautista, I.P. López, C. Lluís, J.L. Labandeira-García, y R. Franco. 2011. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *J. Psychopharmacol. (Oxford).* 25:97–104.
- Lassiter, R.N.T., S.B. Reynolds, K.D. Marin, T.F. Mayo, y M.R. Stark. 2009. FGF Signaling Is Essential for Ophthalmic Trigeminal Placode Cell Delamination and Differentiation. *Dev Dyn.* 238:1073–1082.

- Laviolette, S.R., y A.A. Grace. 2006. Cannabinoids Potentiate Emotional Learning Plasticity in Neurons of the Medial Prefrontal Cortex through Basolateral Amygdala Inputs. *J. Neurosci.* 26:6458–6468.
- Ledent, C., J.M. Vaugeois, S.N. Schiffmann, T. Pedrazzini, M. El Yacoubi, J.J. Vanderhaeghen, J. Costentin, J.K. Heath, G. Vassart, y M. Parmentier. 1997. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature.* 388:674–678.
- Lee, S.P., B.F. O’Dowd, G.Y. Ng, G. Varghese, H. Akil, A. Mansour, T. Nguyen, y S.R. George. 2000. Inhibition of cell surface expression by mutant receptors demonstrates that D2 dopamine receptors exist as oligomers in the cell. *Mol. Pharmacol.* 58:120–128.
- Lee, S.P., C.H. So, A.J. Rashid, G. Varghese, R. Cheng, A.J. Lança, B.F. O’Dowd, y S.R. George. 2004. Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.* 279:35671–35678.
- Lefkowitz, R.J. 1998. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273:18677–18680.
- Limbird, L.E., P.D. Meyts, y R.J. Lefkowitz. 1975. Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64:1160–1168.
- Lindskog, M. 2008. Modelling of DARPP-32 regulation to understand intracellular signaling in psychiatric disease. *Pharmacopsychiatry.* 41 Suppl 1:S99–S104.
- Litsiou, A., S. Hanson, y A. Streit. 2005. A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development.* 132:4051–4062.
- Little, J.P., E.B. Villanueva, y A. Klegeris. 2011. Therapeutic potential of cannabinoids in the treatment of neuroinflammation associated with Parkinson’s disease. *Mini Rev Med Chem.* 11:582–590.
- Liu, Q. -R, C. -H Pan, A. Hishimoto, C. -Y Li, Z. -X Xi, A. Llorente-Berzal, M. -P Viveros, H. Ishiguro, T. Arinami, E.S. Onaivi, y G.R. Uhl. 2009. Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes, Brain and Behavior.* 8:519–530.
- López-Carballo, G., L. Moreno, S. Masiá, P. Pérez, y D. Baretino. 2002. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 277:25297–25304.
- López-Moreno, J.A., A. López-Jiménez, M.A. Gorriti, y F.R. de Fonseca. 2010. Functional interactions between endogenous cannabinoid and opioid systems: focus on alcohol, genetics and drug-addicted behaviors. *Curr Drug Targets.* 11:406–428.

-
- Mackie, K. 2005. Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. *Life Sci.* 77:1667–1673.
- Mackie, K. 2008. Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286:S60–65.
- Maggio, R., Z. Vogel, y J. Wess. 1993. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular «cross-talk» between G-protein-linked receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3103–3107.
- Mailleux, P., y J.J. Vanderhaeghen. 1992. Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci. Lett.* 148:173–176.
- Makita, Y., S. Okuno, y H. Fujisawa. 1990. Involvement of activator protein in the activation of tryptophan hydroxylase by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 268:185–188.
- Malan, T.P., Jr, M.M. Ibrahim, H. Deng, Q. Liu, H.P. Mata, T. Vanderah, F. Porreca, y A. Makriyannis. 2001. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain.* 93:239–245.
- Maldonado, R., O. Valverde, y F. Berrendero. 2006. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 29:225–232.
- Marcellino, D., P. Carriba, M. Filip, A. Borgkvist, M. Frankowska, I. Bellido, S. Tanganelli, C.E. Müller, G. Fisone, C. Lluís, L.F. Agnati, R. Franco, y K. Fuxe. 2008. Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology.* 54:815–823.
- Marcellino, D., D.C.S. Roberts, G. Navarro, M. Filip, L. Agnati, C. Lluís, R. Franco, y K. Fuxe. 2007. Increase in A2A receptors in the nucleus accumbens after extended cocaine self-administration and its disappearance after cocaine withdrawal. *Brain Res.* 1143:208–220.
- Marchant, L., C. Linker, P. Ruiz, N. Guerrero, y R. Mayor. 1998. The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Dev. Biol.* 198:319–329.
- Margeta-Mitrovic, M., Y.N. Jan, y L.Y. Jan. 2000. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron.* 27:97–106.
- Marinissen, M.J., y J.S. Gutkind. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* 22:368–376.
- Marsicano, G., S. Goodenough, K. Monory, H. Hermann, M. Eder, A. Cannich, S.C. Azad, M.G. Cascio, S.O. Gutiérrez, M. van der Stelt, M.L. López-Rodríguez, E. Casanova, G. Schütz, W. Zieglgänsberger, V. Di Marzo, C. Behl, y B. Lutz. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science.* 302:84–88.

- Marsicano, G., y B. Lutz. 1999. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur. J. Neurosci.* 11:4213–4225.
- Martín, A.B., E. Fernandez-Espejo, B. Ferrer, M.A. Gorriti, A. Bilbao, M. Navarro, F. Rodríguez de Fonseca, y R. Moratalla. 2008. Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology.* 33:1667–1679.
- Martín-Calderón, J.L., R.M. Muñoz, M.A. Villanúa, I. del Arco, J.L. Moreno, F.R. de Fonseca, y M. Navarro. 1998. Characterization of the acute endocrine actions of (-)-11-hydroxy-delta8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl (HU-210), a potent synthetic cannabinoid in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 344:77–86.
- Martinez-Mir, M.I., A. Probst, y J.M. Palacios. 1991. Adenosine A2 receptors: selective localization in the human basal ganglia and alterations with disease. *Neuroscience.* 42:697–706.
- Di Marzo, V. 2002. Endocannabinoids in the new millennium. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 66:91–92.
- Di Marzo, V. 2008. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov.* 7:438–455.
- Di Marzo, V. 2011. Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat. Neurosci.* 14:9–15.
- Di Marzo, V., M. Bifulco, y L. De Petrocellis. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 3:771–784.
- Di Marzo, V., T. Bisogno, y L. De Petrocellis. 2007. Endocannabinoids and related compounds: walking back and forth between plant natural products and animal physiology. *Chem. Biol.* 14:741–756.
- Di Marzo, V., A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J.C. Schwartz, y D. Piomelli. 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 372:686–691.
- Di Marzo, V., y L. De Petrocellis. 2010. Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Curr. Med. Chem.* 17:1430–1449.
- Di Marzo, V., L. De Petrocellis, N. Sepe, y A. Buono. 1996a. Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem. J.* 316 (Pt 3):977–984.
- Di Marzo, V., L. De Petrocellis, T. Sugiura, y K. Waku. 1996b. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227:281–288.

-
- Mato, S., E. Aso, E. Castro, M. Martín, O. Valverde, R. Maldonado, y A. Pazos. 2007. CB1 knockout mice display impaired functionality of 5-HT1A and 5-HT2A/C receptors. *J. Neurochem.* 103:2111–2120.
- Mato, S., E. Del Olmo, y A. Pazos. 2003. Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. *Eur. J. Neurosci.* 17:1747–1754.
- Matsuda, L.A., T.I. Bonner, y S.J. Lolait. 1993. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 327:535–550.
- Matsuda, L.A., S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, y T.I. Bonner. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346:561–564.
- Mattera, R., B.J. Pitts, M.L. Entman, y L. Birnbaumer. 1985. Guanine nucleotide regulation of a mammalian myocardial muscarinic receptor system. Evidence for homo- and heterotropic cooperativity in ligand binding analyzed by computer-assisted curve fitting. *J. Biol. Chem.* 260:7410–7421.
- Mayr, B., y M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:599–609.
- McAllister, S.D., y M. Glass. 2002. CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 66:161–171.
- McCabe, K.L., y M. Bronner-Fraser. 2009. Molecular and tissue interactions governing induction of cranial ectodermal placodes. *Dev. Biol.* 332:189–195.
- McGrew, L., M.S.S. Chang, y E. Sanders-Bush. 2002. Phospholipase D Activation by Endogenous 5-Hydroxytryptamine 2C Receptors Is Mediated by G α 13 and Pertussis Toxin-Insensitive G $\beta\gamma$ Subunits. *Mol Pharmacol.* 62:1339–1343.
- McLaughlin, C.R., y M.E. Abood. 1993. Developmental expression of cannabinoid receptor mRNA. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 76:75–78.
- McVey, M., D. Ramsay, E. Kellett, S. Rees, S. Wilson, A.J. Pope, y G. Milligan. 2001. Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J. Biol. Chem.* 276:14092–14099.
- Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N.E. Kaminski, A.R. Schatz, A. Gopher, S. Almog, B.R. Martin, y D.R. Compton. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50:83–90.
- Mechoulam, R., y Y. Gaoni. 1965. Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron.* 21:1223–1229.

- Mechoulam, R., y L. Hanus. 2000. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem. Phys. Lipids*. 108:1–13.
- Meschler, J.P., y A.C. Howlett. 2001. Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology*. 40:918–926.
- Métayé, T., H. Gibelin, R. Perdrisot, y J.-L. Kraimps. 2005. Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell. Signal*. 17:917–928.
- Meulemans, D., y M. Bronner-Fraser. 2005. Central role of gene cooption in neural crest evolution. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 304:298–303.
- Milligan, G., M. Canals, J.D. Padiani, J. Ellis, y J.F. Lopez-Gimenez. 2006. The role of GPCR dimerisation/oligomerisation in receptor signalling. *Ernst Schering Found Symp Proc*. 145–161.
- Minoux, M., G.S. Antonarakis, M. Kmita, D. Duboule, y F.M. Rijli. 2009. Rostral and caudal pharyngeal arches share a common neural crest ground pattern. *Development*. 136:637–645.
- Miyasaka, N., H. Knaut, y Y. Yoshihara. 2007. Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. *Development*. 134:2459–2468.
- Molina-Holgado, E., J.M. Vela, A. Arévalo-Martín, G. Almazán, F. Molina-Holgado, J. Borrell, y C. Guaza. 2002. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J. Neurosci*. 22:9742–9753.
- Molina-Holgado, F., A. Rubio-Araiz, D. García-Ovejero, R.J. Williams, J.D. Moore, A. Arévalo-Martín, O. Gómez-Torres, y E. Molina-Holgado. 2007. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur. J. Neurosci*. 25:629–634.
- Moreau, J.L., y G. Huber. 1999. Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31:65–82.
- Moreira, F.A. 2007. Serotonin, the prefrontal cortex, and the antidepressant-like effect of cannabinoids. *J. Neurosci*. 27:13369–13370.
- Moreno, E., S.H. Vaz, N.-S. Cai, C. Ferrada, C. Quiroz, S.K. Barodia, N. Kabbani, E.I. Canela, P.J. McCormick, C. Lluís, R. Franco, J.A. Ribeiro, A.M. Sebastião, y S. Ferré. 2011. Dopamine-galanin receptor heteromers modulate cholinergic neurotransmission in the rat ventral hippocampus. *J. Neurosci*. 31:7412–7423.
- Mulder, J., T. Aguado, E. Keimpema, K. Barabás, C.J. Ballester Rosado, L. Nguyen, K. Monory, G. Marsicano, V. Di Marzo, Y.L. Hurd, F. Guillemot, K. Mackie, B. Lutz, M. Guzmán, H.-C. Lu, I. Galve-Roperh, y T. Harkany. 2008. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:8760–8765.

-
- Mundell, S.J., y E. Kelly. 1998. The effect of inhibitors of receptor internalization on the desensitization and resensitization of three Gs-coupled receptor responses. *Br. J. Pharmacol.* 125:1594–1600.
- Mundell, S.J., J.S. Luty, J. Willets, J.L. Benovic, y E. Kelly. 1998. Enhanced expression of G protein-coupled receptor kinase 2 selectively increases the sensitivity of A2A adenosine receptors to agonist-induced desensitization. *Br. J. Pharmacol.* 125:347–356.
- Munro, S., K.L. Thomas, y M. Abu-Shaar. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365:61–65.
- Nakazi, M., U. Bauer, T. Nickel, M. Kathmann, y E. Schlicker. 2000. Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 361:19–24.
- Navarro, G., P. Carriba, J. Gandía, F. Ciruela, V. Casadó, A. Cortés, J. Mallol, E.I. Canela, C. Lluís, y R. Franco. 2008. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal.* 8:1088–1097.
- Navarro, G., S. Ferré, A. Cordomi, E. Moreno, J. Mallol, V. Casadó, A. Cortés, H. Hoffmann, J. Ortiz, E.I. Canela, C. Lluís, L. Pardo, R. Franco, y A.S. Woods. 2010. Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J. Biol. Chem.* 285:27346–27359.
- Nechiporuk, A., T. Linbo, K.D. Poss, y D.W. Raible. 2007. Specification of epibranchial placodes in zebrafish. *Development.* 134:611–623.
- Nechiporuk, A., y D.W. Raible. 2008. FGF-dependent mechanosensory organ patterning in zebrafish. *Science.* 320:1774–1777.
- Newman, M.E., y A. Levitzki. 1983. Desensitization of normal rat kidney cells to adenosine. *Biochem. Pharmacol.* 32:137–140.
- Ng, G.Y., B.F. O’Dowd, S.P. Lee, H.T. Chung, M.R. Brann, P. Seeman, y S.R. George. 1996. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227:200–204.
- Nie, J., y D.L. Lewis. 2001a. The proximal and distal C-terminal tail domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate G protein coupling. *Neuroscience.* 107:161–167.
- Nie, J., y D.L. Lewis. 2001b. Structural domains of the CB1 cannabinoid receptor that contribute to constitutive activity and G-protein sequestration. *J. Neurosci.* 21:8758–8764.
- Niehrs, C. 1999. Head in the WNT: the molecular nature of Spemann’s head organizer. *Trends in Genetics.* 15:314–319.
- Niehrs, C., O. Kazanskaya, W. Wu, y A. Glinka. 2001. Dickkopf1 and the Spemann-Mangold head organizer. *Int. J. Dev. Biol.* 45:237–240.

- Nieuwkoop, P.D. 1994. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. Garland Pub. 252 pp.
- NIEUWKOOP, P.D. 1963. Pattern formation in artificially activated ectoderm (*Rana pipiens* and *Ambystoma punctatum*). *Dev. Biol.* 7:255–279.
- Nieuwkoop, P.D., A.G. Johnen, y B. Albers. 1985. The epigenetic nature of early chordate development: inductive interaction and competence. CUP Archive. 392 pp.
- Northcutt, R.G. 2004. Taste buds: development and evolution. *Brain Behav. Evol.* 64:198–206.
- Núñez, E., C. Benito, M.R. Pazos, A. Barbachano, O. Fajardo, S. González, R.M. Tolón, y J. Romero. 2004. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse.* 53:208–213.
- Ohyama, K., Y. Yamano, T. Sano, Y. Nakagomi, M. Wada, y T. Inagami. 2002. Role of the conserved DRY motif on G protein activation of rat angiotensin II receptor type 1A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:362–367.
- Ohyama, T., A.K. Groves, y K. Martin. 2007. The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. *Int. J. Dev. Biol.* 51:463–472.
- Okamoto, Y., J. Morishita, K. Tsuboi, T. Tonai, y N. Ueda. 2004. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.* 279:5298–5305.
- Onaivi, E.S. 2006. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology.* 54:231–246.
- Onaivi, E.S. 2011. Commentary: Functional Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors in the CNS. *Curr Neuropharmacol.* 9:205–208.
- Onaivi, E.S., A. Chakrabarti, y G. Chaudhuri. 1996. Cannabinoid receptor genes. *Prog. Neurobiol.* 48:275–305.
- Onaivi, E.S., H. Ishiguro, J. Gong, S. Patel, A. Perchuk, P.A. Meozzi, L. Myers, Z. Mora, P. Tagliaferro, E. Gardner, A. Brusco, B.E. Akinshola, Q. Liu, B. Hope, S. Iwasaki, T. Arinami, L. Teasenfitz, y G.R. Uhl. 2006. Discovery of the Presence and Functional Expression of Cannabinoid CB2 Receptors in Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1074:514–536.
- Onaivi, E.S., H. Ishiguro, J.-P. Gong, S. Patel, P.A. Meozzi, L. Myers, A. Perchuk, Z. Mora, P.A. Tagliaferro, E. Gardner, A. Brusco, B.E. Akinshola, Q.-R. Liu, S.S. Chirwa, B. Hope, J. Lujilde, T. Inada, S. Iwasaki, D. Macharia, L. Teasenfitz, T. Arinami, y G.R. Uhl. 2008. Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1139:434–449.

Onaivi, E.S., H. Ishiguro, S. Gu, y Q.-R. Liu. 2011. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*.

Padanad, M.S., N. Bhat, B. Guo, y B.B. Riley. 2012. Conditions that influence the response to Fgf during otic placode induction. *Developmental Biology*.

Padanad, M.S., y B.B. Riley. 2011. Pax2/8 proteins coordinate sequential induction of otic and epibranchial placodes through differential regulation of foxi1, sox3 and fgf24. *Dev. Biol.* 351:90–98.

Pagotto, U., y R. Pasquali. 2005. Fighting obesity and associated risk factors by antagonising cannabinoid type 1 receptors. *Lancet*. 365:1363–1364.

Påhlman, S., A.I. Ruusala, L. Abrahamsson, M.E. Mattsson, y T. Esscher. 1984. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ.* 14:135–144.

Palazuelos, J., T. Aguado, A. Egia, R. Mechoulam, M. Guzmán, y I. Galve-Roperh. 2006. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 20:2405–2407.

Palazuelos, J., T. Aguado, M.R. Pazos, B. Julien, C. Carrasco, E. Resel, O. Sagredo, C. Benito, J. Romero, I. Azcoitia, J. Fernández-Ruiz, M. Guzmán, y I. Galve-Roperh. 2009. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain*. 132:3152–3164.

Palazuelos, J., Z. Ortega, J. Díaz-Alonso, M. Guzmán, y I. Galve-Roperh. 2012. CB2 cannabinoid receptors promote neural progenitor cell proliferation via mTORC1 signaling. *J. Biol. Chem.* 287:1198–1209.

Palmer, T.M., y G.L. Stiles. 1997. Structure-function analysis of inhibitory adenosine receptor regulation. *Neuropharmacology*. 36:1141–1147.

Palomäki, V.A.B., M. Lehtonen, J.R. Savinainen, y J.T. Laitinen. 2007. Visualization of 2-arachidonoylglycerol accumulation and cannabinoid CB1 receptor activity in rat brain cryosections by functional autoradiography. *J. Neurochem.* 101:972–981.

Park, B.-Y., y J.-P. Saint-Jeannet. 2008. Hindbrain-derived Wnt and Fgf signals cooperate to specify the otic placode in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 324:108–121.

Park, B.-Y.B.Y., y J.-P.J.P. Saint-Jeannet. 2010. Induction and Segregation of the Vertebrate Cranial Placodes. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).

Parkinson, F.E., y B.B. Fredholm. 1990. Autoradiographic evidence for G-protein coupled A2-receptors in rat neostriatum using [3H]-CGS 21680 as a ligand. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 342:85–89.

Parolaro, D., y T. Rubino. 2002. Is cannabinoid transmission involved in rewarding properties of drugs of abuse? *Br. J. Pharmacol.* 136:1083–1084.

- Patricelli, M.P., M.A. Lovato, y B.F. Cravatt. 1999. Chemical and mutagenic investigations of fatty acid amide hydrolase: evidence for a family of serine hydrolases with distinct catalytic properties. *Biochemistry*. 38:9804–9812.
- Pazos, M.R., E. Núñez, C. Benito, R.M. Tolón, y J. Romero. 2004. Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives. *Life Sci*. 75:1907–1915.
- Pazos, M.R., O. Sagredo, y J. Fernández-Ruiz. 2008. The endocannabinoid system in Huntington's disease. *Curr. Pharm. Des.* 14:2317–2325.
- Peroutka, S.J. 1995. 5-HT receptors: past, present and future. *Trends Neurosci*. 18:68–69.
- Pertwee, R.G. 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* 74:129–180.
- Pertwee, R.G. 1999. Cannabis and cannabinoids: pharmacology and rationale for clinical use. *Forsch Komplementarmed.* 6 Suppl 3:12–15.
- Pertwee, R.G. 2005. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol.* 1–51.
- Pertwee, R.G. 2007. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br. J. Pharmacol.* 152:984–986.
- Pertwee, R.G., y R.A. Ross. 2002. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 66:101–121.
- Peterfreund, R.A., M. MacCollin, J. Gusella, y J.S. Fink. 1996. Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene. *J. Neurochem.* 66:362–368.
- De Petrocellis, L., M.G. Cascio, y V. Di Marzo. 2004. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br. J. Pharmacol.* 141:765–774.
- Pfleger, K.D.G., y K.A. Eidne. 2003. New technologies: bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the detection of real time interactions involving G-protein coupled receptors. *Pituitary.* 6:141–151.
- Pfleger, K.D.G., y K.A. Eidne. 2005. Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem. J.* 385:625–637.
- Phillips, B.T., K. Bolding, y B.B. Riley. 2001. Zebrafish *fgf3* and *fgf8* encode redundant functions required for otic placode induction. *Dev. Biol.* 235:351–365.
- Piccolo, S., E. Agius, L. Leyns, S. Bhattacharyya, H. Grunz, T. Bouwmeester, y E.M. De Robertis. 1999. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature.* 397:707–710.
- Pickel, V.M., J. Chan, T.L. Kash, J.J. Rodríguez, y K. MacKie. 2004. Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Neuroscience.* 127:101–112.

Pickel, V.M., J. Chan, C.S. Kearn, y K. Mackie. 2006. Targeting dopamine D2 and cannabinoid-1 (CB1) receptors in rat nucleus accumbens. *J. Comp. Neurol.* 495:299–313.

Pieper, M., G.W. Eagleson, W. Wosniok, y G. Schlosser. 2011. Origin and segregation of cranial placodes in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 360:257–275.

Pin, J.-P., T. Galvez, y L. Prézeau. 2003. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 98:325–354.

Pin, J.-P., R. Neubig, M. Bouvier, L. Devi, M. Filizola, J.A. Javitch, M.J. Lohse, G. Milligan, K. Palczewski, M. Parmentier, y M. Spedding. 2007. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol. Rev.* 59:5–13.

Piomelli, D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:873–884.

Piomelli, D., M. Beltramo, A. Giuffrida, y N. Stella. 1998. Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol. Dis.* 5:462–473.

Pogoda, H.-M., y M. Hammerschmidt. 2009. How to make a teleost adenohypophysis: molecular pathways of pituitary development in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 312:2–13.

Porter, A.C., J.-M. Sauer, M.D. Knierman, G.W. Becker, M.J. Berna, J. Bao, G.G. Nomikos, P. Carter, F.P. Bymaster, A.B. Leese, y C.C. Felder. 2002. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301:1020–1024.

Price, T.J., G. Helesic, D. Parghi, K.M. Hargreaves, y C.M. Flores. 2003. The neuronal distribution of cannabinoid receptor type 1 in the trigeminal ganglion of the rat. *Neuroscience.* 120:155–162.

Prinster, S.C., C. Hague, y R.A. Hall. 2005. Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol. Rev.* 57:289–298.

Pull, I., y H. McIlwain. 1972. Metabolism of (¹⁴C)adenine and derivatives by cerebral tissues, superfused and electrically stimulated. *Biochem. J.* 126:965–973.

Randall, M.D., D. Harris, D.A. Kendall, y V. Ralevic. 2002. Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol. Ther.* 95:191–202.

Rashid, A.J., C.H. So, M.M.C. Kong, T. Furtak, M. El-Ghundi, R. Cheng, B.F. O'Dowd, y S.R. George. 2007. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:654–659.

Ray, K., y B.C. Hauschild. 2000. Cys-140 is critical for metabotropic glutamate receptor-1 dimerization. *J. Biol. Chem.* 275:34245–34251.

- Raymond, J.R., Y.V. Mukhin, A. Gelasco, J. Turner, G. Collinsworth, T.W. Gettys, J.S. Grewal, y M.N. Garnovskaya. 2001. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol. Ther.* 92:179–212.
- Rebay, I., S.J. Silver, y T.L. Tootle. 2005. New vision from Eyes absent: transcription factors as enzymes. *Trends Genet.* 21:163–171.
- Richfield, E.K., y M. Herkenham. 1994. Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann. Neurol.* 36:577–584.
- Rivers, J.R.-J., y J.C. Ashton. 2010. The development of cannabinoid CBII receptor agonists for the treatment of central neuropathies. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 10:47–64.
- Rocheville, M., D.C. Lange, U. Kumar, S.C. Patel, R.C. Patel, y Y.C. Patel. 2000a. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science.* 288:154–157.
- Rocheville, M., D.C. Lange, U. Kumar, R. Sasi, R.C. Patel, y Y.C. Patel. 2000b. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* 275:7862–7869.
- Rodríguez de Fonseca, F., I. Del Arco, F.J. Bermudez-Silva, A. Bilbao, A. Cippitelli, y M. Navarro. 2005. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* 40:2–14.
- Rodríguez de Fonseca, F., J.A. Ramos, A. Bonnin, y J.J. Fernández-Ruiz. 1993. Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport.* 4:135–138.
- Rodriguez, J.J., K. Mackie, y V.M. Pickel. 2001. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J. Neurosci.* 21:823–833.
- Romand, R., P. Dollé, y E. Hashino. 2006. Retinoid signaling in inner ear development. *J. Neurobiol.* 66:687–704.
- Romano, C., J.K. Miller, K. Hyrc, S. Dikranian, S. Mennerick, Y. Takeuchi, M.P. Goldberg, y K.L. O'Malley. 2001. Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol. Pharmacol.* 59:46–53.
- Romano, C., W.L. Yang, y K.L. O'Malley. 1996. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* 271:28612–28616.
- Rosin, D.L., A. Robeva, R.L. Woodard, P.G. Guyenet, y J. Linden. 1998. Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 401:163–186.
- Ross, R.A. 2003. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 140:790–801.

Ross, R.A., A.A. Coutts, S.M. McFarlane, S. Anavi-Goffer, A.J. Irving, R.G. Pertwee, D.J. MacEwan, y R.H. Scott. 2001. Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology*. 40:221–232.

Rozenfeld, R., A. Gupta, K. Gagnidze, M.P. Lim, I. Gomes, D. Lee-Ramos, N. Nieto, y L.A. Devi. 2011. AT1R-CB₁R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J*. 30:2350–2363.

Ryberg, E., N. Larsson, S. Sjögren, S. Hjorth, N.-O. Hermansson, J. Leonova, T. Elebring, K. Nilsson, T. Drmota, y P.J. Greasley. 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol*. 152:1092–1101.

Sadaghiani, B., y C.H. Thiébaud. 1987. Neural crest development in the *Xenopus laevis* embryo, studied by interspecific transplantation and scanning electron microscopy. *Dev. Biol*. 124:91–110.

Sagredo, O., S. González, I. Aroyo, M.R. Pazos, C. Benito, I. Lastres-Becker, J.P. Romero, R.M. Tolón, R. Mechoulam, E. Brouillet, J. Romero, y J. Fernández-Ruiz. 2009. Cannabinoid CB₂ receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia*. 57:1154–1167.

Samson, M.-T., A. Small-Howard, L.M.N. Shimoda, M. Koblan-Huberson, A.J. Stokes, y H. Turner. 2003. Differential roles of CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors in mast cells. *J. Immunol*. 170:4953–4962.

Sánchez, C., M.L. de Ceballos, T. Gomez del Pulgar, D. Rueda, C. Corbacho, G. Velasco, I. Galve-Roperh, J.W. Huffman, S. Ramón y Cajal, y M. Guzmán. 2001. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB₂ cannabinoid receptor. *Cancer Res*. 61:5784–5789.

Sánchez, M.G., L. Ruiz-Llorente, A.M. Sánchez, y I. Díaz-Laviada. 2003. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell. Signal*. 15:851–859.

Sañudo-Peña, M.C., S.L. Patrick, S. Khen, R.L. Patrick, K. Tsou, y J.M. Walker. 1998. Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett*. 248:171–174.

Scallet, A.C. 1991. Neurotoxicology of cannabis and THC: a review of chronic exposure studies in animals. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 40:671–676.

Scarselli, M., M. Armogida, S. Chiacchio, M.G. DeMontis, A. Colzi, G.U. Corsini, y R. Maggio. 2000. Reconstitution of functional dopamine D_{2s} receptor by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments. *Eur. J. Pharmacol*. 397:291–296.

Schatz, A.R., M. Lee, R.B. Condie, J.T. Pulaski, y N.E. Kaminski. 1997. Cannabinoid receptors CB₁ and CB₂: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 142:278–287.

- Schier, A.F. 2001. Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:393–404.
- Schlicker, E., J. Timm, J. Zentner, y M. Göthert. 1997a. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 356:583–589.
- Schlicker, E., J. Timm, J. Zentner, y M. Göthert. 1997b. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 356:583–589.
- Schlosser, G. 2002. Development and evolution of lateral line placodes in amphibians I. Development. *Zoology (Jena)*. 105:119–146.
- Schlosser, G. 2006. Induction and specification of cranial placodes. *Dev. Biol.* 294:303–351.
- Schlosser, G. 2007. How old genes make a new head: redeployment of Six and Eya genes during the evolution of vertebrate cranial placodes. *Integr. Comp. Biol.* 47:343–359.
- Schlosser, G. 2008. Do vertebrate neural crest and cranial placodes have a common evolutionary origin? *Bioessays*. 30:659–672.
- Schlosser, G. 2010. Making senses development of vertebrate cranial placodes. *Int Rev Cell Mol Biol.* 283:129–234.
- Schlosser, G., y K. Ahrens. 2004. Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 271:439–466.
- Schulte, G., y B.B. Fredholm. 2003. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell. Signal.* 15:813–827.
- Schulz, A., R. Grosse, G. Schultz, T. Gudermann, y T. Schöneberg. 2000. Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors. *J. Biol. Chem.* 275:2381–2389.
- Seifert, R., y K. Wenzel-Seifert. 2002. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 366:381–416.
- Sexl, V., G. Mancusi, C. Höller, E. Gloria-Maercker, W. Schütz, y M. Freissmuth. 1997. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272:5792–5799.
- Sharir, H., y M.E. Abood. 2010. Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol. Ther.* 126:301–313.
- Shen, M., T.M. Piser, V.S. Seybold, y S.A. Thayer. 1996. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci.* 16:4322–4334.

Sheng, G., M. dos Reis, y C.D. Stern. 2003. Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation. *Cell*. 115:603–613.

Sheng, W.S., S. Hu, X. Min, G.A. Cabral, J.R. Lokensgard, y P.K. Peterson. 2005. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia*. 49:211–219.

Shimeld, S.M., y P.W.H. Holland. 2000. Vertebrate Innovations. *PNAS*. 97:4449–4452.

Van Sickle, M.D., M. Duncan, P.J. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N. Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, J.S. Davison, L.J. Marnett, V. Di Marzo, Q.J. Pittman, K.D. Patel, y K.A. Sharkey. 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 310:329–332.

Sidhpura, N., y L.H. Parsons. 2011. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity and addiction-related behavior. *Neuropharmacology*. 61:1070–1087.

Sjödäl, M., T. Edlund, y L. Gunhaga. 2007. Time of exposure to BMP signals plays a key role in the specification of the olfactory and lens placodes ex vivo. *Dev. Cell*. 13:141–149.

Skaper, S.D., A. Buriani, R. Dal Toso, L. Petrelli, S. Romanello, L. Facci, y A. Leon. 1996. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:3984–3989.

Smart, D., y J.C. Jerman. 2000. Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:134.

Spano, M.S., P. Fadda, W. Fratta, y L. Fattore. 2010. Cannabinoid-opioid interactions in drug discrimination and self-administration: effect of maternal, postnatal, adolescent and adult exposure to the drugs. *Curr Drug Targets*. 11:450–461.

Ständer, S., M. Schmelz, D. Metze, T. Luger, y R. Rukwied. 2005. Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 38:177–188.

Stark, M.R., J. Sechrist, M. Bronner-Fraser, y C. Marcelle. 1997. Neural tube-ectoderm interactions are required for trigeminal placode formation. *Development*. 124:4287–4295.

Stehle, J.H., S.A. Rivkees, J.J. Lee, D.R. Weaver, J.D. Deeds, y S.M. Reppert. 1992. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.* 6:384–393.

Stella, N., y D. Piomelli. 2001. Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 425:189–196.

Stella, N., P. Schweitzer, y D. Piomelli. 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 388:773–778.

6. Bibliografía

- Stern, C.D. 2005. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development*. 132:2007–2021.
- Stern, C.D., J. Charite, J. Deschamps, D. Duboule, A.J. Durston, M. Kmita, J.-F. Nicolas, I. Palmeirim, J.C. Smith, y L. Wolpert. 2006. Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems? *The International Journal of Developmental Biology*. 50:3–15.
- Streit, A. 2002. Extensive cell movements accompany formation of the otic placode. *Dev. Biol.* 249:237–254.
- Streit, A. 2004. Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev. Biol.* 276:1–15.
- Streit, A., y C.D. Stern. 1999. Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mech. Dev.* 82:51–66.
- Stryer, L. 1978. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* 47:819–846.
- Suárez, J., R. Llorente, S.Y. Romero-Zerbo, B. Mateos, F.J. Bermúdez-Silva, F.R. de Fonseca, y M.-P. Viveros. 2009. Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus*. 19:623–632.
- Sugiura, T., S. Kishimoto, S. Oka, y M. Gokoh. 2006. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog. Lipid Res.* 45:405–446.
- Sugiura, T., S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita, y K. Waku. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:89–97.
- Sugiura, T., y K. Waku. 2000. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem. Phys. Lipids*. 108:89–106.
- Sun, S.-K., C.T. Dee, V.B. Tripathi, A. Rengifo, C.S. Hirst, y P.J. Scotting. 2007. Epibranchial and otic placodes are induced by a common Fgf signal, but their subsequent development is independent. *Developmental Biology*. 303:675–686.
- Svenningsson, P., H. Hall, G. Sedvall, y B.B. Fredholm. 1997. Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse*. 27:322–335.
- Svenningsson, P., C. Le Moine, G. Fisone, y B.B. Fredholm. 1999. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog. Neurobiol.* 59:355–396.
- Svízenská, I., P. Dubový, y A. Sulcová. 2008. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90:501–511.

-
- Szabo, B., L. Dörner, C. Pfreundtner, W. Nörenberg, y K. Starke. 1998. Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience*. 85:395–403.
- Szolcsányi, J. 2000. Are cannabinoids endogenous ligands for the VR1 capsaicin receptor? *Trends Pharmacol. Sci.* 21:41–42.
- Tecott, L.H., L.M. Sun, S.F. Akana, A.M. Strack, D.H. Lowenstein, M.F. Dallman, y D. Julius. 1995. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. *Nature*. 374:542–546.
- Terrillon, S., y M. Bouvier. 2004. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 5:30–34.
- Thorn, J.A., y S.M. Jarvis. 1996. Adenosine transporters. *Gen. Pharmacol.* 27:613–620.
- Torres, M., y F. Giráldez. 1998. The development of the vertebrate inner ear. *Mech. Dev.* 71:5–21.
- Trazzi, S., M. Steger, V.M. Mitrugno, R. Bartsaghi, y E. Ciani. 2010. CB1 Cannabinoid Receptors Increase Neuronal Precursor Proliferation Through AKT/Glycogen Synthase Kinase-3 β /B-Catenin Signaling. *J. Biol. Chem.* 285:10098–10109.
- Tribulo, C., M.J. Aybar, V.H. Nguyen, M.C. Mullins, y R. Mayor. 2003. Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification. *Development*. 130:6441–6452.
- Tsou, K., K. Mackie, M.C. Sañudo-Peña, y J.M. Walker. 1999. Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*. 93:969–975.
- Tümpel, S., L.M. Wiedemann, y R. Krumlauf. 2009. Hox genes and segmentation of the vertebrate hindbrain. *Curr. Top. Dev. Biol.* 88:103–137.
- Turu, G., y L. Hunyady. 2010. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 44:75–85.
- Valverde, O. 2005. Participation of the cannabinoid system in the regulation of emotional-like behaviour. *Curr. Pharm. Des.* 11:3421–3429.
- Valverde, O., R. Maldonado, E. Valjent, A.M. Zimmer, y A. Zimmer. 2000. Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. *J. Neurosci.* 20:9284–9289.
- Vanhoutte, P.M. 1991. Serotonin, hypertension and vascular disease. *Neth J Med.* 38:35–42.
- Venance, L., R. Maldonado, y O. Manzoni. 2004. [Endocannabinoids in the central nervous system]. *Med Sci (Paris)*. 20:45–53.

- Viscomi, M.T., S. Oddi, L. Latini, N. Pasquariello, F. Florenzano, G. Bernardi, M. Molinari, y M. Maccarrone. 2009. Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *J. Neurosci.* 29:4564–4570.
- Wager-Miller, J., R. Westenbroek, y K. Mackie. 2002. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem. Phys. Lipids.* 121:83–89.
- Walther, D.J., y M. Bader. 2003. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* 66:1673–1680.
- Ward, R.J., J.D. Pediani, y G. Milligan. 2011. Heteromultimerization of cannabinoid CB(1) receptor and orexin OX(1) receptor generates a unique complex in which both protomers are regulated by orexin A. *J. Biol. Chem.* 286:37414–37428.
- Wawersik, S., P. Purcell, M. Rauchman, A.T. Dudley, E.J. Robertson, y R. Maas. 1999. BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev. Biol.* 207:176–188.
- Wellik, D.M. 2009. Hox genes and vertebrate axial pattern. *Curr. Top. Dev. Biol.* 88:257–278.
- Werry, T.D., K.J. Gregory, P.M. Sexton, y A. Christopoulos. 2005. Characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor signaling to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J. Neurochem.* 93:1603–1615.
- Westlake, T.M., A.C. Howlett, T.I. Bonner, L.A. Matsuda, y M. Herkenham. 1994. Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience.* 63:637–652.
- White, J.H., A. Wise, M.J. Main, A. Green, N.J. Fraser, G.H. Disney, A.A. Barnes, P. Emson, S.M. Foord, y F.H. Marshall. 1998. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature.* 396:679–682.
- Wilkinson, D.G. 1993. Molecular mechanisms of segmental patterning in the vertebrate hindbrain and neural crest. *Bioessays.* 15:499–505.
- Wilson, R.I., y R.A. Nicoll. 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science.* 296:678–682.
- Wirkner, K., H. Assmann, L. Köles, Z. Gerevich, H. Franke, W. Nörenberg, R. Boehm, y P. Illes. 2000. Inhibition by adenosine A(2A) receptors of NMDA but not AMPA currents in rat neostriatal neurons. *Br. J. Pharmacol.* 130:259–269.
- Wong, H.M., M.J. Sole, y J.W. Wells. 1986. Assessment of mechanistic proposals for the binding of agonists to cardiac muscarinic receptors. *Biochemistry.* 25:6995–7008.
- Woods, A.S., y M.A. Huestis. 2001. A study of peptide--peptide interaction by matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12:88–96.

Woods, A.S., J.M. Koomen, B.T. Ruotolo, K.J. Gillig, D.H. Russel, K. Fuhrer, M. Gonin, T.F. Egan, y J.A. Schultz. 2002. A study of peptide-peptide interactions using MALDI ion mobility o-TOF and ESI mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13:166–169.

Wotherspoon, G., A. Fox, P. McIntyre, S. Colley, S. Bevan, y J. Winter. 2005. Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience.* 135:235–245.

Wreggett, K.A., y J.W. Wells. 1995. Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. *J. Biol. Chem.* 270:22488–22499.

Xi, Z.-X., X.-Q. Peng, X. Li, R. Song, H.-Y. Zhang, Q.-R. Liu, H.-J. Yang, G.-H. Bi, J. Li, y E.L. Gardner. 2011. Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat. Neurosci.* 14:1160–1166.

Xie, X.-Q., J.-Z. Chen, y E.M. Billings. 2003. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB₂ receptor. *Proteins.* 53:307–319.

Yamaguchi, T.P. 2001. Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr. Biol.* 11:R713–724.

Zangen, A., M. Solinas, S. Ikemoto, S.R. Goldberg, y R.A. Wise. 2006. Two brain sites for cannabinoid reward. *J. Neurosci.* 26:4901–4907.