



TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA
OLIGOMERIZACIÓN SOBRE LA
SELECTIVIDAD FUNCIONAL DE
RECEPTORES ACOPLADOS A
PROTEÍNAS G
APLICACIÓN A LA FARMACOLOGÍA DE
LA ESQUIZOFRENIA**

Laura Gómez García

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021



Dña. **Laura Gómez García**

Título de **Estudio del efecto de la oligomerización sobre la selectividad**
la tese: **funcional de receptores acoplados a proteínas G. Aplicación a la**
farmacología de la esquizofrenia.

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso de que el original no esté en la Escuela.

En Santiago de Compostela, Julio de 2021.

Firma electrónica



Dña. **María Isabel Loza García**

En condición de: **Titor/a e director/a**

D. **José Manuel Brea Floriani**

En condición de: **Director/a**

Título de la tese: **Estudio del efecto de la oligomerización sobre la selectividad funcional de receptores acoplados a proteínas G. Aplicación a la farmacología de la esquizofrenia.**

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. Laura Gómez García, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo a su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, Julio de 2021

María Isabel Loza García

José Manuel Brea Floriani



FINANCIACIÓN

Para la realización de la presente tesis doctoral se ha contado con la financiación otorgada por la Xunta de Galicia (GRC2014/011 y ED431C 2018/21), el ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-57138-C2-1-R y SAF2017-85225- C3-1-R) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

La doctoranda ha sido beneficiaria de la ayuda de apoyo a la etapa predoctoral en las universidades del SUG, en los organismos públicos de investigación de Galicia y en otras entidades del Sistema gallego de I+D+i, cofinanciadas parcialmente por el programa operativo FSE Galicia 2014-2020, concedida por la Consellería de Cultura, Educación y Ordenación Universitaria (convocatoria 2017).





AGRADECIMIENTOS

Es abrumador lo rápido que pasa el tiempo una vez echas la vista atrás y piensas en la fugacidad con la que ha pasado esta etapa de tu vida. Aunque si lo meditas con detenimiento, en realidad, has vivido cantidad de momentos únicos y has aprendido todo lo posible de esta experiencia para intentar sacarle el máximo jugo, y eso no habría sido posible sin todas las personas que te han acompañado de una manera u otra en esta aventura.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores, Pepo y Mabel, porque, a pesar de los vaivenes, no dejaron de confiar en mí y siempre me abrieron las puertas del grupo de investigación para poder desarrollar este trabajo en él. La perseverancia y la lucha contra la frustración cuando no salen las cosas creo que es de los mayores aprendizajes que me llevo, y en esto, Pepo, has tenido mucho que ver. Gracias por transmitirme esos valores.

Igualmente, todo este trabajo no se puede acabar sin las personas que a diario forman parte de tu vida durante estos años y con las que compartes tantas horas. Siempre he recibido toda la ayuda que he necesitado y me he sentido arropada y comprendida por todos y cada uno de mis compañeros del grupo Biofarma, así que os doy las gracias a todos por acogirme y acompañarme cada día. En especial me gustaría agradecer a Silvia, porque desde ese turno de cultivos que nos unió, me has apoyado y enseñado mucho, pero es que, además, me has acompañado en todas mis historietas y nos hemos reído mucho juntas. Te tengo un cariño muy especial.

Coincidir con personas que desde el inicio te lo ponen todo tan fácil y te devuelven las ganas de averiguar de qué va este mundillo y lo que te puede aportar toda esta etapa, es algo que no me esperaba encontrar en un principio, pero lo encontré contigo, Alex, desde que pisé este edificio por primera vez y me hiciste el “tour” por los laboratorios. Gracias por los buenos momentos que pasamos, gracias por enseñarme con esa pasión y gracias por facilitarme todo con tu sonrisa. Gracias por ser mi maestro Jedi.

Por supuesto gracias a todos los Odiosos. Me habéis ido dejando sola aquí pero el tiempo compartido ha sido mucho, tanto dentro como fuera, comiendo mucho y rico, bailando y pasándolo bien por ahí, pero sobre todo acompañándonos a diario en esta etapa. Las gallinas por su experiencia y

sus consejos, gracias Ampe, Cris, Óscar, Alba y Luci. Carlos, nuestro último año pandémico nos ha acercado todavía más y me ha encantado poder disfrutarlo y reírme contigo como lo hemos hecho, gracias por los buenos momentos. Y qué decir de las *gemeliers*, mis compañeras de doctorado y mis asesoras, mis guías en este difícil camino. Marta, gracias por tanto, gracias por toda tu ayuda día a día, pero sobre todo por transmitirme tu espíritu imparable y tu fuerza para ir a por todo y más. Elia, gracias por tu rigurosidad, toda la sabiduría que has compartido conmigo y por esa visión crítica de la vida que siempre tienes y me parece fundamental y admirable.

Mi *Pocholit* y mi *Calvito*, no sé qué habría hecho sin vosotros. Nunca cuentas con encontrarte con personas tan afines a ti, pero ir conociéndoos poco a poco e ir entablando la amistad que hoy en día tenemos ha sido toda una maravilla y de lo mejor que me llevo de esta etapa. Andrea has sido mi confidente, mi apoyo, mi compañera y, en definitiva, ¡mi amiga! Muchas noches juntas hablando hasta las mil, muchos consejos mutuos y muchas charlas de lo que sea necesario para darnos todo ese cariño y comprensión que a veces es tan necesario. Eres una persona increíble que me enseña muchísimo cada día, por eso creo que me voy a aplicar el cuento también y cada vez que me haga falta pensar: ¿qué haría Andrea? Gracias por todo. David, mira que me has machacado con ese “humor” que te caracteriza, pero una vez que he aprendido a sobrellevarlo (lo mío me ha costado, me falta humor como tú dices) solo puedo darte las gracias. Hasta el final conmigo ayudándome y sobre todo dándome todo el apoyo en los peores momentos. Nunca olvidaré nuestras múltiples charlas y todo el cariño que he sentido por tu parte, aunque siempre te tenga que robar los abrazos. Os quiero mucho.

A veces la vida te sorprende y aparecen personas nuevas de la manera más inesperada y no puedes ni imaginarte en ese momento lo que van a significar para ti. Y esa eres tú, Ángela. El destino quiso unirnos en el mejor momento y todo lo demás ya fue rodado. Quién me iba a decir a mí que iba a encontrar a una persona tan parecida a mí, con ese espíritu, esa alegría y esa energía que me ha devuelto a la vida. Que lo vivido en tan poco tiempo sea tan intenso e importante a día de hoy en mi vida, solo tiene que ver contigo. Gracias por aguantarme día a día, todo el rato, a todas horas. Sigamos así, como dos gotas de agua mucho tiempo, ¿vale?

Me encantaría recordar también a todos mis compañeros de Montpellier y, por supuesto, agradecer a mis supervisores allí, Jean-Philippe Pin y Laurent Prézeau por darme la oportunidad de realizar mi estancia en su grupo y enseñarme ese amor por la ciencia. No sé cómo fui tan afortunada de encajar tan bien con gente tan diferente en tan poco tiempo, pero doy las gracias por ello. Os llevo en mi cabeza y mi corazón.

Amigas de toda la vida que te conocen mejor que nadie, amigas de la carrera que te comprenden mejor que nadie y cantidad de amigas y amigos más recientes que te acompañan a diario como nadie y que durante este tiempo han formado parte de esta aventura, solo puedo decir que gracias a todos por todo. Todos sois un cachito de mí y eso me encanta.

Por último, me siento muy afortunada de poder contar con el apoyo de la familia. Incluso cuando la familia está lejos, como ha sido mi caso, he podido contar con “mi familia gallega”, con todo su cariño y su ayuda incondicional. Os doy las gracias por haberme hecho sentir como en casa, por escucharme y animarme siempre. Y aunque nuestro contacto ya no sea tan estrecho, siempre os voy a querer a todos y cada uno de vosotros y os voy a llevar conmigo. A ti también Edi, porque creo que eres de las personas que más ha sufrido y me ha acompañado en este proceso y, a pesar de todo, te agradezco tu apoyo enormemente.

Y mi familia, mi familia riojana, siempre unidos a pesar de la distancia y las circunstancias, pero siempre apostando por mí. Somos muchos, familia gitana, y os quiero mucho a todos, pero doy las gracias en especial a mis padres, por todos los esfuerzos que han tenido que hacer para que yo pueda haber llegado hasta aquí, y a mis hermanas, porque somos como una piña con un vínculo especial y un amor incondicional con el que sé que siempre puedo contar. LMA.

Una de las maravillas de la ciencia es que cuando los científicos no saben algo pueden probar todo tipo de teorías y conjeturas, pelearse y luchar, pero al final acaban admitiendo su ignorancia. La ciencia es esfuerzo, perseverancia y mucha humildad. Démosle el valor que se merece y apoyémosla por encima de todo.

Ha sido un bonito camino junto a todos vosotros. Gracias.





ÍNDICE



ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS	21
RESUMEN	27
Resumen	29
Abstract	31
INTRODUCCIÓN	33
1. Receptores de membrana acoplados a proteínas G.	35
1.1 Estructura.	35
1.2 Clasificación.	37
1.3 Aspectos farmacológicos de los GPCRs.	39
<i>1.3.1 Modelos de activación de GPCRs.</i>	39
<i>1.3.2 Selectividad funcional.</i>	43
<i>1.3.3 Alosterismo.</i>	44
1.4 Proteínas G y vías de señalización.	46
1.5 Dianas terapéuticas.	51
2. GPCRs de interés en la esquizofrenia.	53
2.1 Aspectos generales de la esquizofrenia.	53
<i>2.1.1 Etiopatología.</i>	53
<i>2.1.2 Hipótesis fisiopatológicas de la esquizofrenia.</i>	55
<i>2.1.3 Síntomas y diagnóstico.</i>	57
<i>2.1.4 Tratamiento con antipsicóticos.</i>	59
2.2 GPCRs involucrados en el tratamiento de la esquizofrenia.	61
<i>2.2.1 Receptores de dopamina D₂.</i>	62
<i>2.2.2 Receptores de serotonina 5-HT_{2A}.</i>	67
<i>2.2.3 Receptores de serotonina 5-HT₇.</i>	70
3. Oligomerización de GPCRs	74

3.1 Aspectos generales	74
3.2 Oligómeros relevantes en el sistema nervioso central.	80
3.2.1 Heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$	84
ANTECEDENTES, HIPOTESIS Y OBJETIVOS	89
Antecedentes	91
Hipótesis	93
Objetivo	93
MATERIALES Y MÉTODOS	95
Materiales	97
1. Reactivos generales	97
2. Reactivos empleados en cultivos celulares	97
3. Reactivos empleados en ensayos funcionales	97
3.1 Reactivos farmacológicos	98
4. Reactivos empleados en ensayos de radiactividad	99
5. Reactivos empleados en ensayos de biología molecular	99
5.1 Anticuerpos	100
Métodos	101
1. Cultivo celular	101
1.1 Línea celular	101
1.2 Mantenimiento celular.	101
1.3 Descongelación celular.	102
1.4 Expansión celular.	102
1.5 Criopreservación celular.	103
2. Ensayos funcionales de medición de AMPc intracelular. ...	103

2.1 Ensayos de medida de formación de AMPc modulada por los receptores D ₂ y 5-HT ₇	105
2.2 Ensayos de medida de formación de AMPc modulada por heterodímero D ₂ /5-HT _{2A}	106
3. Ensayos funcionales de medida de acumulación de IP intracelular.....	107
4. Ensayos funcionales de medida de movilización de calcio intracelular.....	108
5. Ensayos de heterodimerización de los receptores D ₂ y 5-HT ₇	109
5.1 Preparación de muestras.....	110
5.2 Coinmunoprecipitación y western blot.....	110
6. Modulación de la actividad de PKA.....	112
6.1 Medida de la expresión de PKA por western blot.....	112
6.1.1 Preparación de muestras.....	112
6.1.2 Western blot de proteínas fosforiladas.....	113
6.2 Medida de la actividad de PKA por inmunoensayo.....	113
6.3 Medida de la fosforilación de CREB por tecnología Alpha®.....	115
7. Análisis de datos.....	117
RESULTADOS.....	121
1. Estudio de la señalización cruzada entre los receptores D ₂ y 5-HT ₇ y su farmacología.....	123
1.1 Estudio de la señalización cruzada entre los receptores D ₂ y 5-HT ₇	123
1.1.1 Los agonistas del receptor D ₂ modulan la vía de señalización de la serotonina a través del receptor 5-HT ₇	124
1.1.2 Los antagonistas del receptor D ₂ no influyen en la vía de señalización de la serotonina a través del receptor 5-HT ₇	125

1.1.3 Los agonistas del receptor D_2 modulan la vía de señalización del receptor $5-HT_7$ bloqueado por su antagonista específico SB269970.	126
1.1.4 Los antagonistas del receptor D_2 no modulan la vía de señalización del receptor $5-HT_7$ bloqueado por su antagonista específico SB269970.	128
1.1.5 El efecto de la dopamina y el haloperidol en la señalización serotoninérgica del receptor $5-HT_7$ es mediado a través de la proteína $G_{i/o}$	129
1.2 La señalización cruzada entre los receptores D_2 y $5-HT_7$ no se atribuye a una oligomerización de estos receptores.	132
1.2.1 Estudio de la expresión del receptor $5-HT_7$ endógeno en la línea celular de trabajo.	132
1.2.2 Estudio de la expresión del receptor D_2 sobreexpresado en la línea celular de trabajo.	133
1.2.3 El cruce de la señalización de los receptores D_2 y $5-HT_7$ no implica una estructura cuaternaria heterodimérica.	133
2. Estudio de la señalización intracelular cruzada del heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$ y su farmacología.	135
2.1 Estudio de la activación del receptor $5-HT_{2A}$ y su efecto sobre la respuesta de la dopamina en el receptor D_2.	135
2.1.1 La serotonina estimuló la producción de AMPc en presencia de forskolina en la línea celular que coexpresa los receptores D_2 y $5-HT_{2A}$	136
2.1.2 El agonista alucinógeno $5-HT_{2A}$, (\pm) DOI, estimuló la producción de AMPc en presencia de forskolina en la línea celular que coexpresa los receptores D_2 y $5-HT_{2A}$	138
2.1.3 La producción de especies de inositol fosfato estimulada por los agonistas $5-HT_{2A}$, (\pm) DOI y serotonina, es independiente de forskolina.	139

2.2 Estudio de la implicación de diferentes proteínas de la cascada intracelular de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en la señalización cruzada del heterodímero.	141
2.2.1 <i>El efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (±) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂, es independiente de la inhibición de la proteína G_{i/o} por la toxina pertussis.</i>	143
2.2.2 <i>La inhibición de la proteína G_q por el compuesto YM-254890 revirtió el efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (±) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂.</i>	146
2.2.3 <i>La inhibición de la fosfolipasa C por el compuesto 48/80 revirtió el efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (±) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂.</i>	149
2.2.4 <i>El efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (±) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂ es independiente del calcio intracelular.</i>	152
2.2.5 <i>El efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (±) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂ es independiente de la inhibición de la proteína Quinasa C por el compuesto Ro32-0432.</i>	157
2.2.6 <i>La inhibición de la proteína quinasa A por el compuesto PKI14-22 revirtió el efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (±) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂.</i>	160
2.2.7 <i>La actividad de la proteína quinasa A se vio modificada en presencia del agonista alucinógeno de 5-HT_{2A}, (±) DOI.</i>	163
2.2.7.1 <i>La actividad de la PKA aumentó en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI.</i>	164
2.2.7.2 <i>La fosforilación de la PKA aumentó en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI.</i>	165
2.2.7.3 <i>La activación de CREB aumentó en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI.</i>	167

DISCUSIÓN.	169
CONCLUSIONES.	193
Conclusiones.	195
Conclusions.	197
REFERENCIAS.	199





ABREVIATURAS Y SIGLAS



ABREVIATURAS Y SIGLAS

(±) DOI	(±)2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina
5-CT	5-carboxitriptamina
5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
5-HT₍₁₋₇₎	Receptor de serotonina tipo 1-7
A₍₁₋₂₎	Receptor de adenosina tipo 1-2
AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Alpha[®]	<i>Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay</i>
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARIP.	Aripiprazol
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BAPTA	Ácido 1,2 Bis (2-animofenoxi) etano-N,N,N',N' tetraacético
BCA	Ácido bicinconínico
BRET	Energía de transferencia resonante bioluminiscente
BSA	Albúmina de suero bovino
CaM	Calmodulina
CB₍₁₋₂₎	Receptor de cannabinoide tipo 1-2
CCR5	Receptor de quimioquinas C-C de tipo 5
CFP	Proteína Fluorescente Cian
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CTC	Complejo Ternario Cúbico
CXCR4	Receptor de quimioquinas C-X-C de tipo 4
D₍₁₋₅₎	Receptor de dopamina tipo 1-5
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc de 32 kDa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMS-5	<i>Manual Diagnóstico y Estadístico de desórdenes mentales quinta edición</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Eficacia
EC₅₀	Concentración estimuladora 50
ECL	Bucle extracelular

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
E_{FSK}	Eficacia máxima sobre el efecto de la FSK
E_{max}	Eficacia máxima del agonista
EP₁	Receptor de prostaglandina tipo 1
EPAC	Proteína intercambiadora activada por AMPc
ERK	Quinasa regulada por factores extracelulares
FBS	Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	Transferencia de energía resonante fluorescente
FRT	Diana Flp recombinante
FSK	Forskolina
g	Unidad relativa de medida de la aceleración igual a la aceleración de la gravedad
GDP	Guanosin difosfato
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GTP	Guanosin trifosfato
GABA_(B1/B2)	Receptores del ácido gamma-aminobutírico tipo B1/B2
h	Hora
H₃	Receptor de histamina tipo 3
HALO.	Haloperidol
HBSS	Solución salina tamponada de Hank
HEK293	Células embrionarias de riñón humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetansulfónico
HRP	Peroxidasa de rábano
HTRF	<i>Homogeneous Time Resolved Fluorescence</i>
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
ICD-11	<i>Clasificación Internacional de Desórdenes</i> decimoprimer edición
ICL	Bucle intracelular
IP	Inmunoprecipitación
IPs	Especies de inositol fosfato
IP₃	Inositol trifosfato
KET.	Ketanserina
LSD	Dietilamida del ácido lisérgico

M₂	Receptor muscarínico tipo 2
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
mGlu_(1/5)	Receptor de glutamato tipo 1/5
min	Minuto
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
PBS	Tampón fosfato salino
PDE	Fosfodiesterasa
PFC	Córtex prefrontal
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA	Ensayo de ligación por proximidad
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PTX	Toxina <i>Pertussis</i>
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
QUIN.	Quinpirol
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SB	Sustancia Negra
SB.	SB269970
SDS	Dodecilsulfato sódico
SST₂	Receptor de somatostatina tipo 2
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción
SULP.	Sulpirida
Tap.	Tapsigargina
TBS	Suero tamponado con Tris
TM	Transmembrana
TMB	3, 3', 5, 5' tetrametilbencidina
VTA	Área tegmental ventral
YFP	Proteína Fluorescente Amarilla
(δ, κ, μ) OP	Receptor opioide tipo δ , κ o μ





RESUMEN



RESUMEN

Las enfermedades mentales son desórdenes psiquiátricos con sintomatología variada, con un origen multifactorial y con una etiopatogenia en muchos casos desconocida que afecta a múltiples vías cerebrales, conlleva la desregulación de neurotransmisores y en la que están implicadas diversas dianas farmacológicas. Para el tratamiento sintomático de algunos de estos trastornos mentales, como la esquizofrenia, se emplean fármacos antipsicóticos que tienen como dianas los receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs). En el caso de esta enfermedad, los antipsicóticos son antagonistas principalmente del receptor de dopamina D_2 y del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$.

El avance en el estudio de los GPCRs y los nuevos modelos de activación de receptores ha permitido confirmar que estas moléculas no actúan exclusivamente como monómeros, sino que también pueden formar complejos de mayor orden como dímeros y oligómeros. Estos complejos oligoméricos pueden interactuar con distintos ligandos y pueden acoplarse a distintos efectores dando lugar a una señalización diferente de la correspondiente a sus entidades monoméricas.

La identificación del heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$, tanto *in vitro* como *ex vivo*, y la existencia demostrada de una señalización cruzada entre ambos receptores, llevaron a pensar que la modulación farmacológica de este heterodímero podría ser fundamental en el tratamiento de la esquizofrenia. Así, en la presente tesis doctoral se ha estudiado a nivel funcional el cruzamiento de la señalización intracelular de los protómeros que forman el heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$, con el fin de conocer la farmacología y contribuir al conocimiento de este complejo macromolecular clave en el desarrollo de nuevos fármacos antipsicóticos.

En estudios previos se había observado un efecto modulador del agonista de receptores $5-HT_{2A}$, (\pm) DOI, sobre la respuesta de la dopamina en el receptor D_2 . Mediante el empleo de inhibidores de distintas proteínas de la cascada de señalización intracelular de ambos protómeros, D_2 y $5-HT_{2A}$, se confirmó la existencia de una señalización cruzada o *crossstalk* entre los receptores D_2 y $5-HT_{2A}$ dependiente de la vía proteína quinasa A

(PKA)/CREB, a través de la activación de la proteína G_q y la fosfolipasa C, pero independiente de calcio, de proteína quinasa C, o de diacilglicerol.

De esta manera, los resultados obtenidos permiten ampliar el conocimiento de la farmacología de este heterodímero implicado en enfermedades mentales como la esquizofrenia posibilitando mejorar el diseño de futuros nuevos fármacos antipsicóticos.



ABSTRACT

Mental illnesses are psychiatric disorders with a variable symptomatology, a multifactorial origin and an unknown etiopathogenesis that can affect multiples neural pathways, dysregulate numerous neurotransmitters and involve different pharmacological targets. Antipsychotic drugs targeting G-protein-coupled receptors (GPCRs) are employed for the symptomatic treatment of some of these mental disorders, such as schizophrenia. Specifically in this disease, antipsychotics are mainly antagonist of D₂ dopamine receptor and 5-HT_{2A} serotonin receptor.

Advances in GPCRs molecular studies and new models of receptor activation confirmed that these receptors do not exclusively act as monomers, but also can form higher-order complexes such as dimers or oligomers. These oligomeric complexes have their own interactome and signalosome, so they can interact with different ligands and couple with various effector proteins leading to multiples intracellular signals different from that corresponding to the monomeric entities.

D₂/5-HT_{2A} heterodimer identification, both *in vivo* and *ex vivo*, and the proved existence of a crosstalk signalling between these receptors, led to propose that pharmacological modulation of this heterodimer could be essential for schizophrenia treatment. Thus, in this doctoral thesis, we studied the intracellular crosstalk between both protomers of D₂/5-HT_{2A} heterodimer, with the purpose of gaining knowledge about the pharmacology of this macromolecular complex key in the development of new antipsychotic drugs.

In previous studies, it had been observed a modulation in dopamine-D₂ receptor response in the presence of 5-HT_{2A} hallucinogenic agonist (\pm) DOI. In this work, we employed inhibitors of different proteins involved in the signalling pathways of both protomers, D₂ and 5-HT_{2A}, and we demonstrated that (\pm) DOI modulator effect is due to a crosstalk between D₂ and 5-HT_{2A} receptors through PKA/CREB mediated pathway, through the activation of G_q protein and phospholipase C, but independent of calcium, protein kinase C and diacylglycerol.

In this regard, the results we obtained allow to expand the pharmacological knowledge of this heterodimer involved in mental

disorders such as schizophrenia, leading to an improvement in new future antipsychotic drugs design.





INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Receptores de membrana acoplados a proteínas G.

Los receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) son una superfamilia de siete dominios transmembrana altamente conservados que se caracterizan por transmitir señales al interior celular a través de la membrana plasmática interactuando con proteínas de unión a nucleótidos de guanina o proteínas G.

Estos receptores son capaces de reconocer gran variedad de moléculas extracelulares entre las que se incluyen aminas, purinas y derivados de ácidos nucleicos, lípidos, péptidos y proteínas de diversos tamaños, odorantes, feromonas y fotones, neurotransmisores e iones como el calcio, entre otros (*Pharmacology, Third Edition*, 2003). Tras la unión de estos ligandos y la interacción a nivel intracelular con las proteínas G, se inicia una cascada de señalización dando lugar a múltiples procesos fisiológicos y patológicos (Venkatakrishnan *et al.*, 2013).

1.1 Estructura.

Los primeros pasos para conocer la estructura de los GPCRs se dieron al conseguir la estructura bidimensional cristalizada de la rodopsina bovina (**Figura 1A**) (Schertler, Villa and Henderson, 1993; Palczewski *et al.*, 2000). Unos años después, se cristalizó por primera vez el receptor humano β_2 adrenérgico (Cherezov *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007). Esto permitió un aumento muy rápido de las técnicas necesarias para conseguir la estructura cristalina de numerosos receptores (cristalografías con rayos X, criomicroscopía electrónica, resonancia magnética nuclear...). Gracias a los cristales de los diversos GPCRs se obtuvo información específica de su arquitectura tridimensional, los sitios de unión de sus ligandos y detalles atómicos de las interacciones entre ligando-receptor.

Los estudios realizados concluyeron que los GPCRs comparten una estructura común basada en un polipéptido con un extremo amino terminal extracelular, un extremo carboxilo terminal intracelular. Poseen siete dominios transmembrana hidrofóbicos, consistentes en segmentos α -helicoidales, que se denominan TM1-TM7. Estas estructuras

transmembrana están unidas entre sí por 3 bucles extracelulares (ECL1-ECL3) y tres intracelulares (ICL1-ICL3) (**Figura 1B**) (Lu and Wu, 2016). La longitud y composición del extremo amino o carboxilo terminal suele variar dependiendo del receptor y según su funcionalidad. Los bucles extracelulares y los sitios de unión a ligandos, normalmente localizados en el extremo amino, suelen ser lo que más diverge en la estructura de los GPCRs entre las distintas familias (Rosenbaum, Rasmussen and Kobilka, 2009). A consecuencia de estos bucles transmembrana se comenzó a utilizar el término de receptores 7TM para referirse también a los GPCRs.

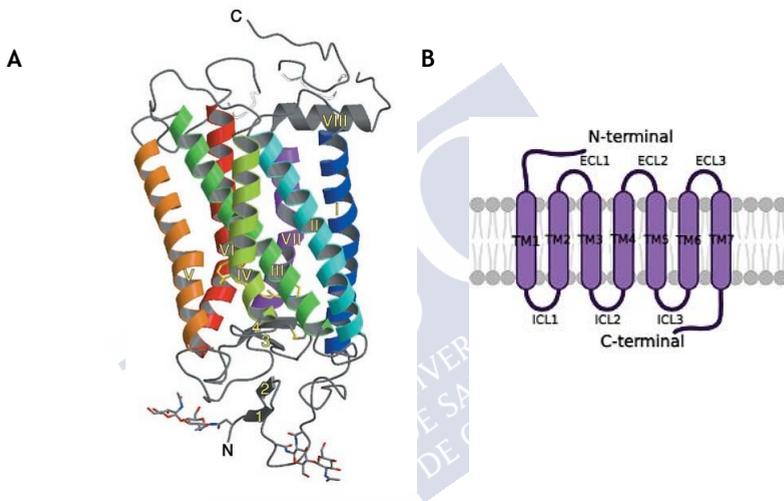


Figura 1. Estructura de los GPCRs. **A)** Estructura de la rodopsina. Con permiso de *The American Association for the Advancement of Science* (Palczewski *et al.*, 2000). **B)** Esquema bidimensional de la estructura de los GPCRs. Imagen creada por la doctoranda en BioRender.com.

El conocimiento de la estructura de los receptores siempre ha jugado un papel importante en el desarrollo de fármacos. Actualmente, gracias a los nuevos avances en la cristalografía de GPCRs, se dispone de 70 estructuras distintas de GPCRs y unos 200 complejos de ligando-receptor en todas las clases de GPCRs humanos (Isberg *et al.*, 2016; Congreve *et al.*, 2020).

1.2 Clasificación.

Se han identificado alrededor de 800 GPCRs en humanos, de los cuales cerca de la mitad tienen funciones sensoriales, mediando olfato, gusto, percepción de la luz o señalización de feromonas (Mombaerts, 2004). Esta superfamilia de receptores comprende aproximadamente el 2% de todas las proteínas codificadas en el genoma humano y pueden clasificarse según su unión a los ligandos, su estructura o su fisiología.

De manera general, el conjunto de GPCRs en animales vertebrados e invertebrados se clasifican usando el sistema A-F que los divide en seis subtipos según la homología en su secuencia básica (Clase A: similares a rodopsina; Clase B: receptores de secretina; Clase C: glutamato metabotrópicos; Clase D: receptores de feromonas de hongos; Clase E: receptores de AMPc; y Clase F: receptores *frizzled/smoothened*) (Alexander *et al.*, 2019). Sin embargo, los estudios filogenéticos más destacados han demostrado que la mayoría de los GPCRs humanos pueden agruparse en cinco grandes familias, dando lugar al sistema de clasificación GRAFS (acrónimo de los grupos), (Fredriksson *et al.*, 2003; Schiöth and Fredriksson, 2005) que comprende los siguientes grupos (**Figura 2**):

- 1) Glutamato: esta familia se compone de 15 receptores entre los que se encuentran ocho receptores de glutamato, dos receptores GABA, un receptor sensible a calcio y cuatro receptores del gusto. El sitio de reconocimiento de los ligandos específicos se encuentra en el extremo amino que forma como una cavidad característica denominada *venus fly trap* (Pin and Acher, 2002).
- 2) Rodopsina: es la familia más grande y dentro de ella se encuentran los GPCRs sensoriales. Se caracterizan por contener una serie de aminoácidos altamente conservados en los dominios transmembrana y suelen contener un puente disulfuro entre los bucles extracelulares 1 y 2. La unión de los ligandos específicos de esta clase de receptores se encuentra en los siete dominios transmembrana (Baldwin, 1994). A su vez, esta gran familia se divide en cuatro subfamilias (α , β , γ y δ).
- 3) Adhesión: esta familia de receptores se caracteriza por tener un extremo amino terminal considerablemente más largo que el resto

de familias (entre 200 y 2800 aminoácidos) y en el que se encuentran varios dominios como regiones ricas en glicosilaciones, motivos con cisteínas conservadas y residuos de prolinas, que participan en la adhesión celular (Harmar, 2001).

- 4) Frizzled/Taste2: esta familia incluye dos tipos de receptores, 1) los receptores del gusto, que se expresan en la lengua y el epitelio del paladar y están relacionados con el sentido amargo del gusto; y 2) los receptores Frizzled, que controlan la localización, proliferación y polaridad celular durante el desarrollo mediante la unión de glicoproteínas llamadas Wnt (Slusarski, Corces and Moon, 1997). Esta familia también se caracteriza por presentar cisteínas altamente conservadas en el extremo amino que permiten la unión de los ligandos Wnt.
- 5) Secretina: los ligandos de esta familia de receptores son péptidos grandes que comparten un patrón de aminoácidos establecido y suelen actuar de una manera paracrina. El extremo amino terminal contiene puentes entre cisteínas conservados y es importante en la unión de los ligandos a estos receptores.

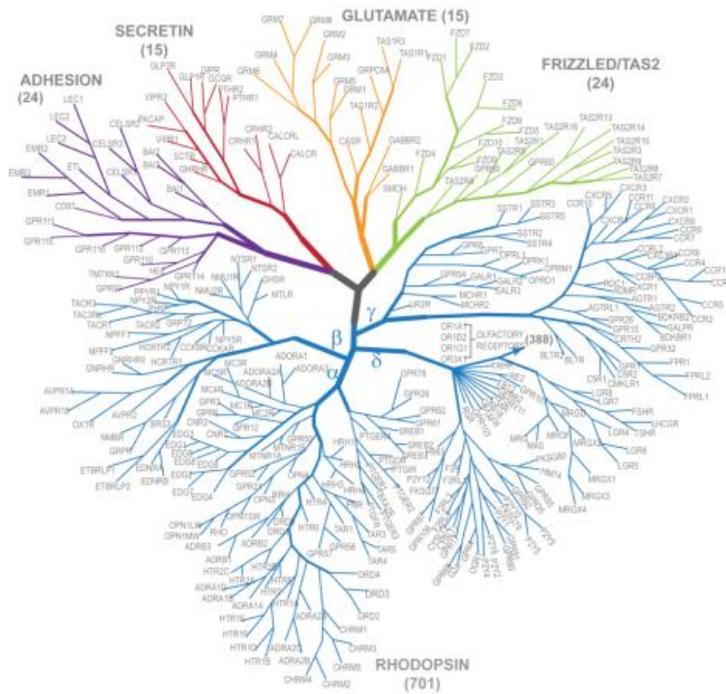


Figura 2. Árbol filogenético de las diferentes familias y subfamilias de GPCRs. Con permiso de Elsevier (Kufareva et al., 2011).

1.3 Aspectos farmacológicos de los GPCRs.

1.3.1 Modelos de activación de GPCRs.

Históricamente, muchos de los conceptos funcionales relacionados con la interacción de los ligandos con los GPCRs fueron descritos basándose en fenómenos observacionales y estudios de unión de ligando realizados en sistemas recombinantes o endógenos. Hasta que no se produjeron avances tecnológicos en técnicas biofísicas y de alta resolución (como los rayos X, la cristalografía o las resonancias magnéticas nucleares) no se pudo estudiar en profundidad las interacciones ligando-receptor. En un inicio, los estudios bioquímicos sugirieron que la activación de los GPCRs generaba cambios en las hélices de los dominios transmembrana (Farrens et al., 1996). En la actualidad, gracias a la cristalografía y la microscopía crioelectrónica, se ha

aumentado el conocimiento en las distintas conformaciones y estados de activación de los GPCRs (Wacker, Stevens and Roth, 2017).

A lo largo de los años han ido surgiendo muchos modelos teóricos de la activación de los GPCRs para intentar explicar la respuesta que diferentes ligandos producían al unirse al receptor. El modelo de “dos estados” asume que los GPCRs existían en equilibrio entre dos estados: el receptor inactivo (R) y el receptor activo (R*) (Lefkowitz et al., 1993; Leff, 1995; Kenakin, 1996). Este modelo surgió de la observación del efecto de diferentes compuestos sobre órganos aislados e introdujo los conceptos iniciales de agonista y antagonista, siendo el agonista capaz de inducir o estabilizar la forma activa del receptor; mientras que el antagonista no tiene efecto en sí mismo, pero bloquea el sitio de unión al receptor impidiendo el efecto agonista.

Gracias al desarrollo de técnicas bioquímicas de unión, se obtuvo la capacidad de caracterizar más moléculas involucradas en la farmacología de los receptores y su estado de activación. Esto permitió la introducción del modelo del complejo ternario de los GPCRs que fue publicado por primera vez por De Lean y colaboradores (De Lean, Stadel and Lefkowitz, 1980), el cual describe que cuando el receptor es activado por un agonista, se mueve lateralmente en la membrana celular para unirse físicamente a la proteína G.

La aparición de nuevos conceptos a tener en cuenta como la actividad constitutiva de los receptores, en la que la isomerización del receptor inactivo al receptor activo podía ocurrir de manera espontánea, independiente de la unión de ligandos (Seifert and Wenzel-Seifert, 2002); o el agonismo inverso, hicieron surgir un nuevo modelo de la mano de Samama y colaboradores denominado modelo extendido del complejo ternario (ETC) (Samamasb *et al.*, 1993). Este modelo tiene en cuenta dos estados del receptor cuando este no está unido a ligandos: el receptor activo (R_a) e inactivo (R_i); en él se involucra la proteína G como un nuevo participante del sistema y, en el estado de receptor activo, esta proteína se une al receptor y se produce la respuesta fisiológica. El ligando puede unirse a cualquier estado del receptor y también puede interactuar con el receptor activo unido a proteína G (R_aG). La propensión del sistema de tener actividad constitutiva, es decir, cuando se genera de manera espontánea la

formación de especies activas del receptor unidas a proteína G (R_aG), viene descrita por la constante alostérica L ($L = [R_a]/[R_i]$) (**figura 3A**).

Como última modificación a tener en cuenta los modelos de activación del receptor, se consideró que el receptor en estado inactivo (R_i) también tiene la capacidad de unirse a la proteína G. Esto dio lugar a un modelo más complejo para los GPCRs que se denominó modelo de complejo ternario cúbico (CTC) (**Figura 3B**) (Kenakin, 2004b).

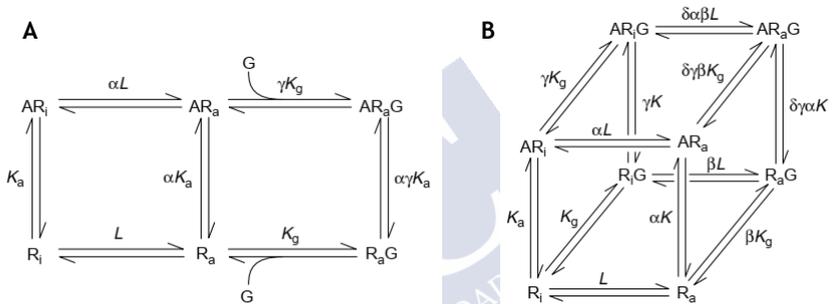


Figura 3. Modelos de complejos ternarios para GPCRs. **A)** Modelo extendido del complejo ternario. **B)** Modelo cúbico del complejo ternario. Donde, R_a (receptor activo), R_i (receptor inactivo), G (proteína G), L (constante alostérica), A (ligando), K_a (afinidad del ligando), α (afinidad diferencial del ligando a R_a), γ (afinidad diferencial del AR_a para G), β (afinidad diferencial del R_a para G), δ (afinidad diferencial del AR_i para G). Con permiso de Elsevier (Kenakin, 2004b).

En la actualidad, los compuestos se caracterizan por tres propiedades moleculares: la afinidad y eficacia para una diana biológica y la ocupación de la diana biológica en un sistema in vivo. Estas cualidades son únicas para cada complejo de ligando y receptor, de manera que se pueden usar para caracterizar la actividad farmacológica de un ligando para un receptor en un tipo celular concreto.

La eficacia de un ligando es el efecto que tiene este sobre la estructura y las propiedades biofísicas de un receptor, y por tanto también de la respuesta biológica que desencadena. Dependiendo de cómo actúen estos ligandos en el receptor, bien sean naturales o sintéticos, se pueden agrupar en diferentes clases de eficacia (**Figura 4**):

- Agonista completo: se une al receptor alterando su estado y dando lugar a una respuesta biológica. Los agonistas convencionales aumentan la actividad del receptor y estimulan la máxima capacidad de respuesta del sistema.
- Agonista parcial: tras la unión al receptor, provoca su activación y aumenta la respuesta biológica pero no alcanza la respuesta máxima.
- Antagonista: se une al receptor normalmente en el mismo sitio de unión que el agonista, sitio ortostérico, y no provoca ningún tipo de respuesta biológica, simplemente evita que otros ligandos puedan unirse al receptor.
- Agonista inverso: se une al receptor reduciendo la actividad basal o constitutiva del receptor.

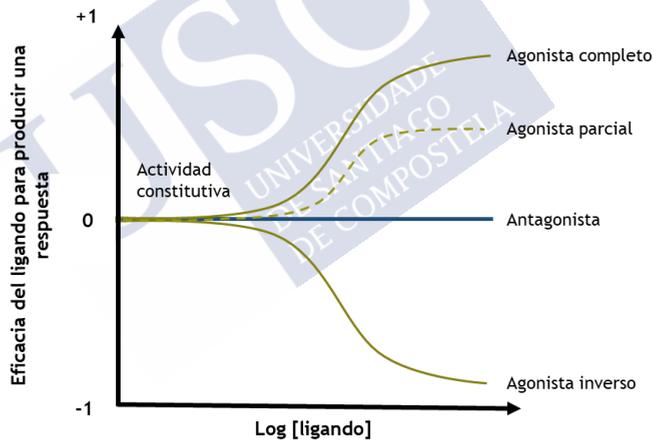


Figura 4. Representación de la clasificación de distintos tipos de ligandos según su eficacia en la generación de una respuesta funcional al unirse a un receptor. Imagen creada por la doctoranda.

El amplio rango de eficacias de ligandos para cada receptor individual depende de múltiples interacciones entre el propio ligando y el GPCR, y requiere más que un simple sitio de unión en el receptor. La estabilización de la conformación del receptor de manera diferencial por distintos ligandos determina su eficacia para señalizar a través de una vía específica

(Rosenbaum, Rasmussen and Kobilka, 2009). Muchos GPCRs pueden estimular múltiples vías de señalización y cada ligando específico puede tener distintas eficacias que estimulen cascadas de transducción diferentes.

1.3.2 *Selectividad funcional.*

Stephenson introdujo el concepto de eficacia por primera vez como la capacidad de una molécula de causar un cambio en el estado de un sistema celular. Se entendió la eficacia como un concepto lineal en el que el agonista produce una activación uniforme del receptor (Stephenson, 1956). Sin embargo, con la ampliación de los estudios y técnicas, se describieron algunas moléculas que no seguían un esquema lineal en un tipo celular concreto para un receptor, como en el caso de algunos agonistas de receptores de dopamina (Lawler *et al.*, 1999; Mottola *et al.*, 2002) y serotonina (Berg *et al.*, 1998). La utilización de sistemas celulares recombinantes permitió entender la heterogeneidad celular y, gracias a ellos, se observó la capacidad de algunos agonistas de inducir múltiples respuestas celulares a través de un mismo receptor. Así, se empezó a estudiar la activación de diferentes proteínas G y β -arrestinas, así como la formación de homo y heterodímeros o complejos oligoméricos mayores; y otros efectos ligados a la activación del receptor como fosforilación e internalización. Estos ligandos con capacidad de desencadenar diferentes cascadas de transducción se describen como ligandos sesgados o con selectividad funcional para ciertas vías de señalización comparados con otros agonistas (Kenakin, 2011).

La selectividad funcional es la forma en la que la unión de un ligando a un receptor provoca una estabilización específica del mismo que después da lugar a una interacción selectiva con diferentes proteínas acopladas para inducir una vía de señalización celular específica. Numerosos estudios han demostrado que algunos ligandos pueden inducir selectivamente unos comportamientos en el receptor y no otros, por lo que se dice que poseen una eficacia colateral, no lineal (Kenakin, 2005). Desde una perspectiva mecanicista, continúa sin estar claro de qué manera los receptores desencadenan señalizaciones sesgadas hacia unas vías u otras, aunque recientemente, estudios biofísicos y estructurales han aportado algunas evidencias (Liu *et al.*, 2012; Rahmeh *et al.*, 2012). Se observó que la unión de distintos ligandos estabiliza el receptor en distintas conformaciones de

manera que quedan unos motivos más accesibles para las proteínas de interés mientras que se desactivan otros, como ocurre en el sesgo del receptor 5-HT_{2B} para señalar a través de β -arrestina al unirse la ergotamina (Wacker *et al.*, 2013). Por otro lado, también se ha demostrado que la conformación de los GPCRs asociada a una señal de transducción específica de una vía depende de las tasas de unión de ligando, de manera que la cinética de los ligandos modula el sesgo hacia diferentes vías, como se ha estudiado en el receptor D₂ de dopamina (Herenbrink *et al.*, 2016) y 5-HT_{2B} y 5-HT_{2A} de serotonina (Wacker *et al.*, 2017).

La clasificación típica de ligandos agonistas y antagonistas era uniforme al considerar una única eficacia medida como la producción de un segundo mensajero o como la respuesta de un tejido, pero tras desarrollar la capacidad de medir múltiples respuestas celulares, esta asociación ya no se considera válida. Por tanto, la selectividad funcional de los compuestos, así como la eficacia colateral, son conceptos a tener en cuenta a la hora de desarrollar futuros fármacos. El desarrollo e identificación de nuevos fármacos con selectividad funcional, representa una de las mayores áreas de la investigación ya que son herramientas químicas importantes que pueden ayudar a aclarar la red de señalización intracelular de los GPCRs y también explorar el papel fisiológico de estos (Kenakin, 2011; Wacker, Stevens and Roth, 2017). Las implicaciones terapéuticas para los compuestos con selectividad funcional están empezando a ser más estudiados en varios sistemas de GPCRs como el adrenérgico, opioide, dopaminérgico, serotoninérgico y receptores de quimioquinas (Violin *et al.*, 2014).

1.3.3 Alosteroismo.

Todos los diferentes ligandos comentados hasta el momento, con sus diferentes efectos sobre el receptor, se une al sitio ortostérico del receptor, es decir, al bolsillo de unión donde se unen los ligandos endógenos del receptor (Neubig *et al.*, 2003). Sin embargo, adicionalmente, los GPCRs pueden ser modulados por ligandos alostéricos, que se unen a sitios de unión distintos al ortostérico.

El alosterismo es un cambio en la conformación del receptor, de manera que, cuando un compuesto alostérico se une al receptor, este

cambia su conformación provocando un cambio en la afinidad o eficacia de sus ligandos ortostéricos (Kenakin, 2004a). Un primer modelo para explicar los efectos alostéricos fue descrito por Ehlert y colaboradores y en él se empleó el término “constante de cooperatividad” para definir al receptor modificado alostéricamente, y se denotó con el símbolo α (Ehlert, 1988). De esta forma, si la afinidad por un ligando A es K_a , la afinidad modificada por un ligando alostérico B es αK_b (Figura 5).

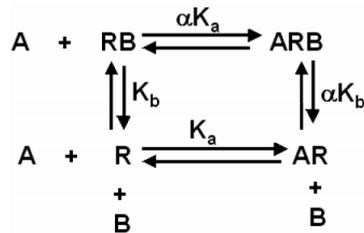


Figura 5. Representación del modelo de los efectos de ligandos alostéricos sobre la afinidad de otros ligandos sobre el GPCRs. Con permiso de *Am Soc for Pharmacology & Experimental Therapeutics* (Ehlert, 1988).

Los ligandos que se unen a sitios alostéricos modifican la conformación del receptor de manera que las propiedades para interactuar con ligandos ortostéricos o acoplarse a otras proteínas pueden cambiar. Generalmente los moduladores alostéricos pueden clasificarse como: 1) moduladores alostéricos positivos (PAMs), que aumentan la afinidad y/o eficacia de los agonistas ortostéricos o los antagonistas; 2) moduladores alostéricos negativos (NAMs), que disminuyen a afinidad y/o eficacia de los ligandos ortostéricos; 3) ligando alostérico neutro (NAL) que no altera el efecto de un ligando ortostérico pero sí que puede impedir su unión, también denominados moduladores alostéricos silentes (SAMs); o 4) ligandos bitópicos, que tienen capacidad de unirse de manera concomitante a sitios ortostéricos y alostéricos (Christopoulos *et al.*, 2014).

En general, la mayoría de los GPCRs tienen como mínimo dos sitios de unión alostéricos: uno en la región intracelular que es reconocido por proteínas de transducción de señales; y otro bolsillo de unión para moléculas pequeñas, que varía entre las familias de GPCRs y se puede encontrar tanto en los dominios transmembrana como en los bucles intra o extracelulares (Kenakin and Miller, 2010).

A pesar de que la investigación en moduladores alostéricos de GPCRs está siendo estudiada desde los años 90, la mayoría de fármacos aprobados continúan uniéndose al bolsillo ortostérico del receptor, solo unos pocos moduladores alostéricos negativos están aprobados por la FDA (Wacker, Stevens and Roth, 2017). Desde el punto de vista del desarrollo de fármacos, y a pesar de los bajos números de fármacos alostéricos aprobados, los moduladores alostéricos continúan siendo compuestos prometedores ya que suelen ser compuestos con mayor diversidad secuencial, lo que hace que sean más selectivos por las dianas y, además, estas dianas no solo pueden ser moduladas por moléculas pequeñas, sino también por anticuerpos o nanoanticuerpos, lo que confiere un mayor rango de actuación de cara al diseño de fármacos. Cabe destacar que es necesario el desarrollo de técnicas que permitan estudiar estos compuestos en profundidad, ya que juegan un papel importante en procesos diversos fisiológicos y enfermedades (Van Der Westhuizen *et al.*, 2015; Changeux and Christopoulos, 2016).

1.4 Proteínas G y vías de señalización.

La comunicación intracelular en los organismos multicelulares es un proceso altamente regulado que asegura la funcionalidad efectiva de todo el cuerpo. Como se ha comentado hasta ahora los GPCRs juegan un papel fundamental en los procesos fisiológicos y también patológicos. Mediante la estimulación de los GPCRs por distintos tipos de moléculas, se produce un cambio en la estructura hacia conformaciones que actúan con proteínas transductoras intracelulares como las proteínas G que desencadenan una cascada de señalización. Es por ello que las proteínas G son cruciales para definir las características temporales y especificidad de las respuestas celulares (Oldham and Hamm, 2008; García-Nafría and Tate, 2019).

Además de la señalización de los GPCRs a través de proteínas G, cabe destacar que estos receptores tienen otras vías de señalización que no están ligadas a las proteínas G, por ejemplo, las dependientes de β -arrestinas, que están implicadas en la internalización y reciclaje del receptor.

Las proteínas G son proteínas heterotriméricas reguladoras de la unión de nucleótidos de guanina. Están formadas por tres subunidades α , β , y γ .

En humanos, hay 21 subunidades α codificadas en 16 genes, 6 subunidades β codificadas en 5 genes y 12 subunidades γ (Downes and Gautam, 1999). Las subunidades β y γ están estrechamente asociadas y se puede considerar que funcionan como una unidad. La subunidad α es la que determina la activación de la proteína ya que tiene la habilidad de cambiar de estado activo a inactivo dependiendo de la unión a GDP o GTP (guanina difosfato o guanina trifosfato) (Duc, Kim and Chung, 2015).

Las proteínas G actúan bioquímicamente como un ciclo de activación y desactivación con función GTPasa. En el estado inactivo, el GDP está unido a la subunidad $G\alpha$ que a su vez está unida al heterodímero $G\beta\gamma$. Con la unión de un ligando al GPCR, este actúa como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) dando lugar a la liberación del GDP que estaba unido a $G\alpha$. La subunidad $G\alpha$ libre, se une a GTP, ya que se encuentra a una concentración celular mayor que el GDP, provocando la activación de la proteína G que se traduce en la liberación del heterodímero $G\beta\gamma$. Ambos complejos ($G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$) tienen capacidad de unirse diferentes efectores y dar lugar a la respuesta celular. El ciclo de activación termina cuando la actividad GTPasa intrínseca que posee la subunidad $G\alpha$ se ve aumentada por proteínas activadoras de GTPasa, como las proteínas RGS (reguladores de la señal de GPCRs). De esta forma la $G\alpha$ hidroliza el GTP a GDP y se reagrupa con el complejo $G\beta\gamma$ (**Figura 6**) (Syrovatkina *et al.*, 2016).

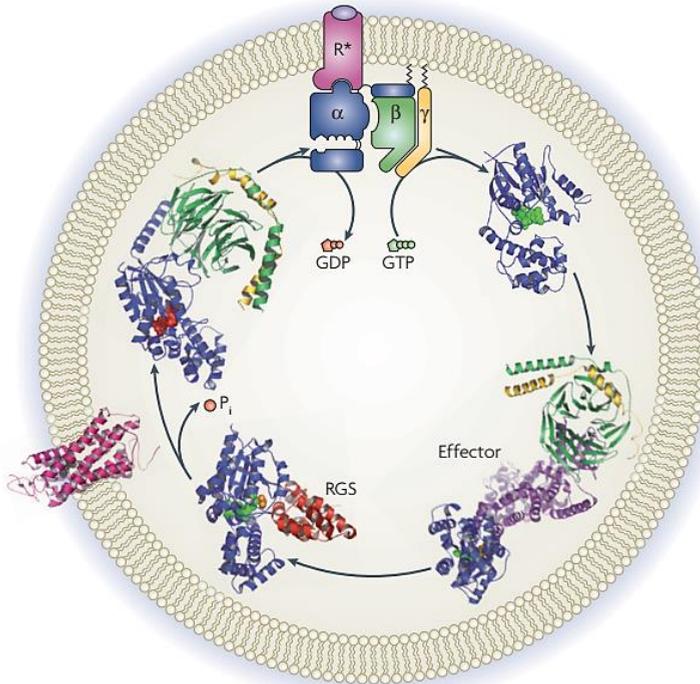


Figura 6. Ciclo de activación de la proteína G. El GPCR (rosa) unido a un ligando, provoca la liberación de GDP (naranja) de la subunidad Gα (azul), que se une a GTP (verde) y se disocia del complejo Gβγ (Verde y amarillo, respectivamente). Ambos complejos interactúan con diferentes efectores (morado). La señalización se termina cuando las proteínas reguladoras de la señal de GPCRs (RGS) (rojo) se unen a Gα y se produce la hidrólisis de GTP a GDP. Con el permiso de *Springer Nature* (Oldham and Hamm, 2008).

Las proteínas G se identifican y clasifican según su subunidad Gα. Basándose en las similitudes funcionales y secuenciales se pueden agrupar en cuatro tipos de proteínas G: Gα_s, Gα_i, Gα_q y Gα₁₂.

- 1) Dentro de la familia Gα_s encontramos dos miembros: 1) Gα_s, la cual se expresa en la mayoría de tipos celulares y tiene función estimuladora de la AC; 2) Gα_{olf} que se expresa en las neuronas sensoriales olfatorias y tiene relación con la función olfativa. La vía de señalización de esta familia es la que se describió originalmente

y sirvió para estudiar conceptos como segundo mensajero, fosforilación de proteínas o transductores de señales (Neves, Ram and Iyengar, 2002). La $G\alpha_s$ estimula la activación de la adenilato ciclasa, que provoca un aumento de AMPc a partir de ATP, y este activa la vía de señalización a través de la proteína quinasa A (PKA). El AMPc es degradado por fosfodiesterasas. Además, el AMPc también actúa sobre las proteínas EPAC (proteínas intercambiadoras activadas por AMPc) que forman una familia de proteínas que intercambian nucleótidos de guanina y tienen efecto sobre pequeñas GTPasas denominadas Rap. La activación de Rap activa la vía de las MAPK quininas (proteínas quininas activadoras mitogénicas) (Marinissen and Gutkind, 2001).

- 2) La familia $G\alpha_i$ es la familia más amplia y diversa, se expresan en la mayoría de tipos celulares y tienen función inhibitoria. Algunos de los subtipos que incluyen esta familia son: $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$, $G\alpha_g$ y $G\alpha_z$. $G\alpha_o$ se expresa principalmente en neuronas, $G\alpha_t$ se expresa en células del ojo ($G\alpha_{t1}$ en los bastones del ojo y $G\alpha_{t2}$ en los conos), $G\alpha_g$ se encuentra en células receptoras del gusto, y $G\alpha_z$ se expresa en tejido neuronal y plaquetas (Syrovatkina *et al.*, 2016). Las proteínas G de esta familia tienen un efecto inhibitorio sobre la adenilato ciclasa, de manera que su activación conlleva una disminución del AMPc. Muchas hormonas importantes y neurotransmisores como la dopamina, la acetilcolina, la epinefrina y la serotonina se acoplan a través de diferentes GPCRs a proteínas G de este tipo para producir su respuesta celular. Además de la inhibición de la adenilato ciclasa, puede regular la actividad de quininas c-Src que tiene efecto sobre los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) y sobre vías de señalización de Rap (Silva, 2004).
- 3) La familia $G\alpha_q$ en humanos incluye cuatro subtipos: $G\alpha_q$ y $G\alpha_{11}$ que se encuentran expresadas ubicuamente, $G\alpha_{14}$ que se expresa principalmente en tejidos de riñón, pulmón e hígado, y $G\alpha_{16}$ que se expresa específicamente en células hematopoyéticas. La activación de estas proteínas lleva a la movilización de calcio como segundo mensajero a través de la estimulación y activación de la fosfolipasa

C (PLC) que produce la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato dando lugar a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). EL IP_3 es el que media la liberación de calcio del retículo endoplasmático que puede activar canales de calcio de la membrana celular permitiendo el flujo de calcio extracelular al interior de la célula. El DAG, por su parte, capta la proteína quinasa C (PKC) a la membrana celular y la activa (Syrovatkina *et al.*, 2016).

- 4) La familia $G\alpha_{12}$ se compone de dos miembros: $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$ que se expresan en la mayoría de células. Esta familia de proteínas G señalizan a través de Rho, que es una familia de pequeñas GTPasas que son moduladas por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), y participan en la transformación celular y desarrollo embrionario (Kozasa *et al.*, 1998; Seasholtz, Majumdar and Brown, 1999).

Respecto al heterodímero $G\beta\gamma$, la subunidad β tiene cinco subtipos $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$ y $G\beta_4$ que se encuentran ampliamente distribuidos por todos los tejidos celulares y $G\beta_5$ que difiere secuencialmente algo más de las anteriores y se encuentra distribuida principalmente en el cerebro. La subunidad γ tiene 13 tipos diferentes que son más diversos y con más variabilidad secuencial entre sí. Originalmente se pensaba que el heterodímero $G\beta\gamma$ servía como regulador negativo de la subunidad $G\alpha$, siendo necesaria su reagrupación para inactivarla y unirse de nuevo al receptor de membrana terminando el ciclo de actuación de la proteína G. Actualmente diversos estudios demuestran que la subunidad $G\beta\gamma$ puede modular diversos efectores por sí misma, alguno como la adenilato ciclasa y la fosfolipasa $C\beta$ compartidos con la subunidad $G\alpha$ (Taussig *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1996). También actúa sobre, quinasas como la PI_3 , y canales de potasio $Kir3$ e inhibe canales de calcio dependientes de voltaje (Dupré *et al.*, 2009) (**Figura 7**).

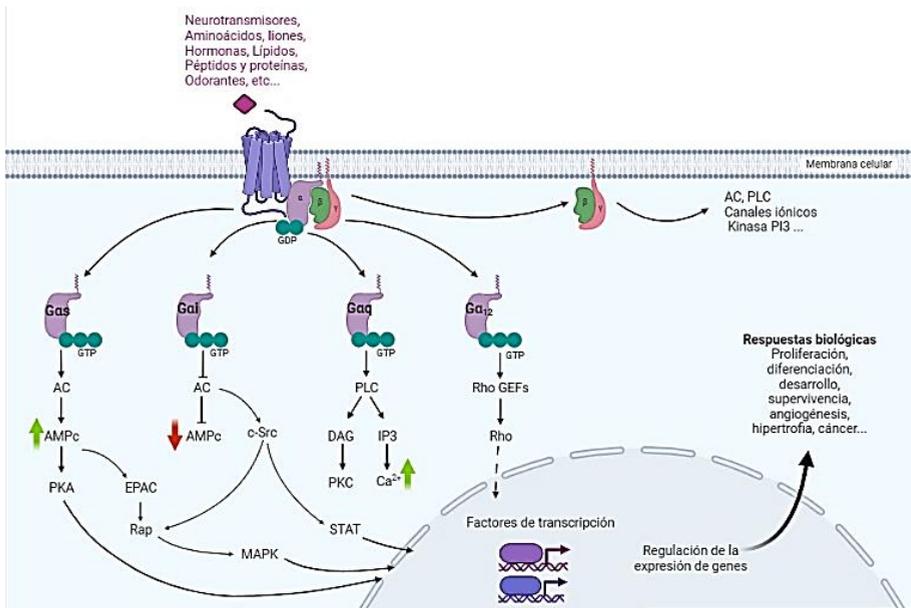


Figura 7. Vías de señalización de proteínas G. Imagen creada por la doctoranda en BioRender.com

1.5 Dianas terapéuticas.

Los GPCRs no sensoriales median la señalización intracelular por diferentes ligandos y son la diana de la mayoría de los fármacos que se utilizan en la clínica, aunque solo una pequeña parte de ellos tienen un uso terapéutico (Overington, Al-Lazikani and Hopkins, 2006; Rask-Andersen, Masuram and Schiöth, 2014). Son considerados dianas farmacológicas de alto interés ya que regulan numerosos y diversos procesos fisiológicos y disponen de sitios de unión accesibles en la superficie de las membranas celulares para ser modulados por fármacos. Alrededor de 500 fármacos aprobados tienen como dianas GPCRs, es decir, aproximadamente entre un 27-34% de los compuestos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) (Overington, Al-Lazikani and Hopkins, 2006; Rask-Andersen, Masuram and Schiöth, 2014). Estos fármacos actúan sobre 107 GPCRs diferentes, lo que corresponde con un 27% de los GPCRs humanos no sensoriales. Más de la mitad del genoma humano codificado de los GPCRs no sensoriales continúa siendo terapéuticamente desconocido por lo

que la investigación en esta área y el desarrollo de nuevas tecnologías para desarrollar nuevos fármacos es fundamental (Hauser *et al.*, 2017).

Los fármacos con GPCRs como diana de actuación se están expandiendo como tratamiento de nuevas enfermedades que hasta la fecha no se habían tratado a través de la modulación de GPCRs, como enfermedades metabólicas (Nauck *et al.*, 2016), enfermedades oncológicas (Bar-Shavit *et al.*, 2016), o enfermedades neurodegenerativas como el alzhéimer (Sushma and Mondal, 2019).

El sistema nervioso central continúa siendo uno de los más representados en las indicaciones de fármacos con dianas en GPCRs. El 27% de todos los fármacos aprobados que tienen como diana GPCRs están destinados al tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. Esto se correlaciona con que, según un análisis de la expresión basal de receptores del atlas de proteínas humanas (Uhlén *et al.*, 2015), más de la mitad de los GPCRs no sensoriales se expresan en la corteza cerebral. Es por ello que, 142 compuestos que tienen como dianas GPCRs están actualmente en ensayos clínicos para indicaciones del sistema nervioso central (Hauser *et al.*, 2017; Congreve *et al.*, 2020). La interacción de múltiples neurotransmisores con GPCRs en el sistema nervioso central hace que estos sean prometedoras dianas terapéuticas para muchos desórdenes psiquiátricos y neurológicos como la esclerosis múltiple, la esquizofrenia, el alzhéimer o la enfermedad de Huntington, entre otros (Komatsu, 2015).

Muchos de los fármacos conocidos tienen sus efectos terapéuticos en múltiples dianas farmacológicas, lo que se conoce como polifarmacología. En el caso de los GPCRs, es bastante frecuente que un mismo fármaco pueda tener diferentes receptores como dianas terapéuticas. A pesar de que la tendencia en el desarrollo de fármacos para GPCRs es buscar la selectividad por una diana, la polifarmacología puede contribuir al entendimiento y tratamiento de algunas enfermedades con múltiples dianas, como es el caso de la esquizofrenia en la que el haloperidol tiene efecto en receptores de dopamina y serotonina (Anighoro, Bajorath and Rastelli, 2014; Butini *et al.*, 2016).

2. GPCRs de interés en la esquizofrenia.

2.1 Aspectos generales de la esquizofrenia.

La esquizofrenia es una enfermedad mental grave que se caracteriza por presentar desórdenes psiquiátricos, como delirios o alucinaciones, apatía y distanciamiento social, y deterioro cognitivo. Las alteraciones en la conducta, el pensamiento y la percepción de la realidad hacen de esta enfermedad una de las diez más discapacitantes a largo plazo. De los desórdenes psiquiátricos, la esquizofrenia es la que genera un mayor coste social y económico ya que requiere numerosos cuidados (Mueser and McGurk, 2004).

Esta enfermedad afecta alrededor del 1% de la población mundial y, a pesar de las variaciones en la prevalencia e incidencia en los diferentes países, un estudio de la Organización Mundial de la Salud demuestra el desarrollo clínico de la esquizofrenia es similar en la mayoría de las culturas y países, tanto desarrollados como en desarrollo (Jablensky *et al.*, 1992).

La esquizofrenia se desarrolla normalmente en la edad adulta temprana o adolescencia tardía (entre los 16 y los 30 años) y de manera igualitaria en ambos sexos. Sin embargo, los hombres suelen tener un inicio más temprano de la enfermedad que las mujeres, y suelen desarrollar más síntomas negativos, peor funcionamiento social y en general peores consecuencias (Jablensky, 2000).

2.1.1 Etiopatología.

Las causas de la esquizofrenia continúan siendo desconocidas, pero se considera un desorden multifactorial que puede desarrollarse por el conjunto de factores genéticos, factores ambientales (sobre todo durante el desarrollo embrionario) y factores sociales.

Diversos estudios llevados a cabo en gemelos y adopciones demostraron que el riesgo de tener esquizofrenia aumentaba cuando se trataba de personas con parentesco familiar con pacientes esquizofrénicos, por lo que se dedujo que había una clara relación genética (McGuffin, Owen and Farmer, 1995; Cardno *et al.*, 1999). Los estudios genéticos más recientes han demostrado un amplio número de variantes genéticas en pacientes con esquizofrenia, desde variaciones importantes en el número

de copias hasta polimorfismos en un solo gen. Se estima que hay alrededor de 120 loci asociados al riesgo de desarrollar esquizofrenia, aunque estos marcadores de riesgo explican el 10% de los casos de esquizofrenia aproximadamente (Kahn *et al.*, 2015). Estudios de asociación del genoma completo han identificado recientemente algún nuevo loci implicado en la esquizofrenia, pero aun así, solo explican el 32% de los casos de esquizofrenia (Xu *et al.*, 2012; Ripke *et al.*, 2013). Algunas variaciones raras en el número de copias, sobre todo asociadas al brazo largo del cromosoma 22, tienen alta penetrancia en esquizofrenia, pero estos casos solo se dan en el 0.3% de todos los pacientes (Hiroi *et al.*, 2013). Recientemente, se han encontrado nuevos aspectos interesantes que relacionan genes involucrados con el sistema inmune y procesos neuroinmunológicos con la patogenia de la esquizofrenia (Deakin, Lennox and Zandi, 2014; Needham and Zandi, 2014). Sin embargo, todavía se desconoce sobre cuántos y qué mecanismos patogénicos actúan estas variaciones genéticas e inmunológicas y cómo contribuyen a los procesos fisiopatológicos de la esquizofrenia.

Además de los factores genéticos, existen factores ambientales, tanto biológicos como psicosociales que afectan al riesgo de desarrollar esquizofrenia. Por un lado, dentro de los factores ambientales biológicos se han descrito situaciones que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad si se experimentan sobre todo en el proceso prenatal o perinatal. Algunas de las complicaciones se pueden dar durante el embarazo como infecciones víricas o bacterianas, malnutrición, diabetes o el consumo de tabaco y otras drogas (Takei *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2001); o también en el momento del nacimiento, como partos prematuros, recién nacidos de bajo peso o que han sufrido hipoxia durante el parto (Cannon, Jones and Murray, 2002). Aunque muchas de estas complicaciones obstétricas no llevan al desarrollo de esquizofrenia, sí que pueden interactuar con factores genéticos dando lugar a un aumento del riesgo.

Por otro lado, numerosos factores psicosociales y sociodemográficos también han demostrado aumentar el riesgo de padecer esquizofrenia. En diversos estudios epidemiológicos se ha relacionado que la pobreza y la pertenencia a una clase social baja aumentan el riesgo, al igual que lo hace la vida en una urbe con respecto a la vida en zonas rurales (Bruce, Takeuchi

and Leaf, 1991; Peen and Dekker, 1997). Factores sociales como el estrés, la migración de personas o el abuso de drogas como el cannabis, juegan un papel fundamental durante la edad adulta, que sumado al resto de factores, puede provocar un mayor riesgo de desarrollar esquizofrenia (Arseneault *et al.*, 2002; Henquet *et al.*, 2005).

2.1.2 Hipótesis fisiopatológicas de la esquizofrenia.

La esquizofrenia es un desorden psiquiátrico en el que está involucrada la disregulación de varios neurotransmisores en múltiples vías de señalización. Algunas de las hipótesis que se barajan para explicar los síntomas de esta enfermedad mental se describen a continuación.

La hipótesis clásica y que mejor se conoce es la hipótesis de la dopamina, la cual se caracteriza por una hiperactividad dopaminérgica en la vía mesolímbica del cerebro, que principalmente afecta a receptores de dopamina D₂. Asimismo, se comprobó que el bloqueo de estos receptores era un tratamiento útil frente a esta enfermedad (Carlsson and Lindqvist, 1963; Seeman and Lee, 1975).

La vía mesolímbica proyecta neuronas desde el área tegmental ventral (VTA) al área del estriado ventral. La hiperactividad de la dopamina en estas áreas provoca los síntomas positivos de la enfermedad como delirios, paranoia y alucinaciones, frecuentemente auditivas. Además de esta vía, también se han estudiado otras vías dopaminérgicas afectadas que permiten explicar los diferentes síntomas de la enfermedad. La hipofunción de la vía mesocortical que proyecta neuronas dopaminérgicas desde la VTA hasta el córtex prefrontal (PFC) podría estar implicada en los síntomas negativos y alteraciones en la cognición. Por otro lado, la vía nigroestriada, cuyos haces se proyectan desde la sustancia negra (SN) hasta el estriado, podría estar implicada en los síntomas extrapiramidales provocados por los antipsicóticos que antagonizan el receptor D₂. Finalmente, la vía tuberoinfundibular cuyas neuronas se encuentran en el hipotálamo, donde la dopamina inhibe la liberación de prolactina, por lo que la hiperprolactinemia típica de los efectos secundarios de los antagonistas de D₂ podría deberse a la implicación de esta vía (**Figura 8**) (Klein *et al.*, 2019).

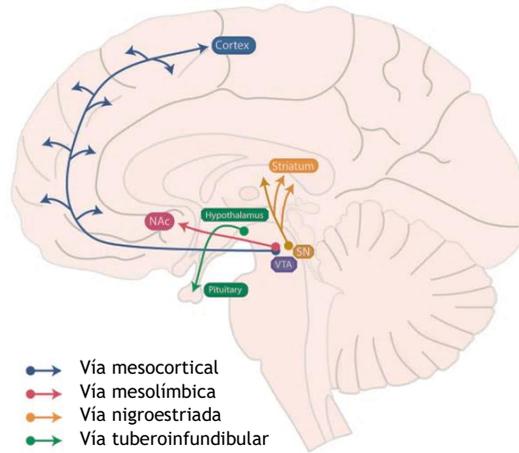


Figura 8. Vías dopaminérgicas afectadas en la esquizofrenia. Con permiso de Springer Nature, modificada de (Klein *et al.*, 2019).

Aunque la hipótesis de la hiperactivación dopaminérgica explica muchos de los síntomas de la esquizofrenia, diversos estudios consideran que otros sistemas de neurotransmisores están implicados en la fisiopatología de la enfermedad.

La hipótesis serotoninérgica está basada en estudios que relacionan las drogas alucinógenas como el ácido lisérgico (LSD) cuya diana farmacológica es el receptor 5-HT_{2A} y sus efectos psicoactivos, con los efectos antipsicóticos de los antagonistas de este receptor como la clozapina o la risperidona y su uso en el tratamiento de la esquizofrenia (Kapur and Remington, 1996; Meltzer and Massey, 2011). La hiperactivación de estos receptores y el exceso de serotonina en neuronas glutaminérgicas del córtex lleva a la liberación de glutamato y podría ser otra explicación para la patología de la esquizofrenia.

De ahí surge la hipótesis glutaminérgica, que se basa en una hipoactividad de los receptores de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato). El glutamato es el neurotransmisor más abundante en el cerebro y las vías glutaminérgicas se extienden por el córtex, el sistema límbico y el tálamo implicadas en la esquizofrenia y, además, algunos antagonistas del receptor NMDA, como la fenciclidina y la ketamina provocan síntomas psicóticos similares a la esquizofrenia (Goff and Coyle, 2001; Farber, 2003; Coyle,

2006). La hipofunción de los receptores NMDA conduce a cambios estructurales y morfológicos en el cerebro que pueden resultar en el desarrollo de psicosis. Hay estudios que demuestran que algunos de los antipsicóticos de segunda generación pueden actuar sobre receptores NMDA y también influir en la transmisión de glutamato actuando en receptores de serotonina (Stone, Morrison and Pilowsky, 2007; Aringhieri *et al.*, 2018).

Es evidente que la fisiopatología de la esquizofrenia no puede ser explicada por una sola alteración molecular, sino que involucra anomalías en el sistema dopaminérgico, así como alteraciones en el sistema serotoninérgico y glutaminérgico provocando el funcionamiento aberrante de las interneuronas que, sumando a los factores genéticos y ambientales, dan lugar a una disfunción cognitiva, de comportamiento y social de los pacientes esquizofrénicos.

2.1.3 Síntomas y diagnóstico.

La esquizofrenia se caracteriza por tres tipos de síntomas principales: positivos, negativos y cognitivos.

Los síntomas positivos son síntomas psicóticos en los que se distorsiona la realidad y entre los que se encuentran alucinaciones visuales y auditivas, delirios, dificultad para organizar pensamientos y ejecución de movimientos extraños. Normalmente estos síntomas son puntuales y tienden a remitir, aunque algunos pacientes experimentan síntomas psicóticos residuales a largo plazo.

Los síntomas negativos afectan a las emociones y a la conducta social, particularmente se desarrolla una pérdida de la motivación e iniciativa, dificultad para expresar emociones, reducción del habla y aislamiento social. Los síntomas cognitivos conllevan un trastorno del pensamiento, que se manifiesta como un discurso distorsionado o ilógico, un fallo en el uso del lenguaje de una manera racional. Los pensamientos no siguen una cadena lógica y una dirección, sino que se disparan sin coherencia. Los síntomas negativos y cognitivos tienden a cronificarse y se asocian con los efectos a largo plazo que afectan a las funciones sociales (Owen, Sawa and Mortensen, 2016).

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza basándose en el historial clínico y mediante la examinación del estado mental, debido a la falta de test diagnósticos y biomarcadores de la enfermedad. Para ello se emplean dos manuales en los que vienen recogidos los síntomas y episodios diferenciales de la esquizofrenia, que son: el *Manual Diagnóstico y Estadístico de desórdenes mentales quinta edición* (DSM-5) publicado por la Asociación Psiquiátrica Americana y el Grupo de Trabajo en la Clasificación de Desórdenes Psiquiátricos (Vahia, 2013); y la *Clasificación Internacional de Desórdenes decimoprimera edición* (ICD-11) desarrollado por la Organización Mundial de la Salud (Reed *et al.*, 2019). Ambos sistemas de clasificación tienen como objetivo la evaluación clínica de los síntomas de la esquizofrenia utilizando varios niveles de gravedad para síntomas positivos, síntomas negativos, síntomas relacionados con el estado de ánimo, síntomas psicmotores y deficiencias cognitivas, con algunas diferencias en los detalles entre ambos sistemas.

Tabla 1. Especificadores de síntomas y curso de la enfermedad descritos en los dos manuales de referencia para el diagnóstico de la esquizofrenia, el DMS5 y el ICD-11 (Gaebel and Zielasek, 2015).

	DMS-5	ICD-11
ESPECIFICADORES DE SÍNTOMAS	Alucinaciones Delirios Discurso desorganizado Comportamiento psicomotor anormal Síntomas negativos Cognición afectada Depresión Manía	Síntomas positivos Síntomas negativos Síntomas depresivos Síntomas maníacos Síntomas psicmotores Cognición afectada
ESPECIFICADORES DEL CURSO DE LA ENFERMEDAD	Primer episodio, actualmente en episodio agudo Primer episodio, actualmente en remisión parcial Primer episodio, actualmente en remisión total Múltiples episodios, actualmente en episodio agudo Múltiples episodios, actualmente en remisión parcial Múltiples episodios, actualmente en remisión total Continuo Inespecífico	

El diagnóstico diferencial con respecto a otros desórdenes mentales se basa en el análisis de las psicosis afectivas, como el trastorno bipolar con características psicóticas y el trastorno depresivo mayor con características

psicóticas; otras psicosis no afectivas estrechamente relacionadas, como por ejemplo trastorno esquizoafectivo, trastorno esquizofreniforme, trastorno delirante, trastorno psicótico breve y trastorno psicótico no especificado de otra manera; trastornos psicóticos inducidos por sustancias (alcohol u otras drogas); y trastornos psicóticos debidos a una afección médica general. También tiene en cuenta la duración de la enfermedad, la naturaleza y el patrón de consumo de sustancias de abuso y la concurrencia con depresión o manía (Owen, Sawa and Mortensen, 2016).

El uso de estos criterios recogidos en los manuales mencionados, han proporcionado unas pautas a seguir confiables para el diagnóstico clínico de la enfermedad, pero como ocurre con todos los desórdenes mentales, la esquizofrenia es una enfermedad compleja y muy variable entre individuos y a lo largo de su desarrollo.

2.1.4 Tratamiento con antipsicóticos.

Debido a la falta de conocimiento y entendimiento de las causas de la esquizofrenia, el tratamiento se basa principalmente en reducir los síntomas de la enfermedad mediante el uso de fármacos antipsicóticos. Este tratamiento farmacológico se completa con psicoterapia para compensar algunos comportamientos cognitivos aberrantes y con ayuda psicosocial que ayude al paciente a manejar aspectos sociales de su día a día (Gaebel and Zielasek, 2015).

La mayoría de los fármacos antipsicóticos son antagonistas de receptores de dopamina, aunque tienen también efecto en otras dianas, sobre todo receptores de serotonina, lo que les hace tener una eficacia y efectos adversos diferentes. En muchos casos el tratamiento con antipsicóticos se da prolongado en el tiempo de manera crónica y tiene efecto en los síntomas positivos de la enfermedad, así como evita recaídas, pero no tienen tanto efecto en los síntomas negativos y cognitivos. Además, presenta numerosos efectos secundarios como efectos extrapiramidales, endocrinos y sedantes, y disminuye la supervivencia debido a arritmias, lo que hace complicada la adherencia al tratamiento por parte de los pacientes (Werner and Coveñas, 2014).

Los primeros antipsicóticos que se descubrieron bloqueaban el receptor de dopamina D_2 y se les denominó como antipsicóticos típicos,

para diferenciarlos de los antipsicóticos atípicos que surgieron más adelante y que no solo bloqueaban el receptor D_2 , sino que también tenían efecto sobre el receptor de serotonina $5HT_{2A}$. Actualmente se emplean más los términos de antipsicóticos de primera, segunda o tercera generación (Maric *et al.*, 2016; Stepnicki, Kondej and Kaczor, 2018).

Los antipsicóticos de primera generación antagonizan el receptor de dopamina D_2 . No presentan selectividad por ninguna vía dopaminérgica concreta (siendo la afectada en la esquizofrenia la vía mesolímbica, principalmente), por lo que dan lugar a numerosos efectos secundarios. Los más destacables son los efectos motores o extrapiramidales (debido al bloqueo de los receptores en la vía nigroestriada), que se caracterizan por distonía, acatisia, discinesia y pseudoparkinsonismo; y la hiperprolactinemia (debido al bloqueo de los receptores en la vía tuberoinfundibular). Algunos de los antipsicóticos de primera generación más característicos son la clorpromacina (descubierta por serendipia por Paul Charpentier en 1950 mientras buscaba fármacos antihistamínicos) (López-Muñoz *et al.*, 2005) y el haloperidol.

Los fármacos antipsicóticos de segunda generación, generalmente, muestran capacidad para bloquear los receptores de serotonina $5-HT_{2A}$ además de los receptores D_2 de dopamina. Asimismo, estos fármacos tienen menor capacidad de antagonizar el receptor D_2 , aunque también puede ser debido a que tienen unas ratios de disociación del receptor más elevados o que son más selectivos por receptores de dopamina localizados en la región cortical o límbica, lo que contribuye a su mayor eficacia frente a los síntomas negativos y cognitivos, y su menor riesgo de desarrollar efectos extrapiramidales. Surgieron pasados casi cuarenta años del descubrimiento de los antipsicóticos típicos, con la aprobación de la clozapina para el tratamiento de la esquizofrenia por la FDA (Crilly, 2007). Además de la clozapina otros fármacos antipsicóticos atípicos aprobados para el tratamiento son: olanzapina, quetiapina, risperidona, paliperidona, ziprasidona y molindona. La clozapina se utiliza como tratamiento de la esquizofrenia cuando esta es resistente a, al menos, otros dos antipsicóticos debido a su alta efectividad en la esquizofrenia resistente a antipsicóticos, sin embargo, tiene tendencia al desarrollo de agranulocitosis por los pacientes, entre otros efectos secundarios, pudiendo ocasionarles la muerte

(Mijovic and MacCabe, 2020). Por su parte, la risperidona, que se introdujo en el mercado veinte años después de la clozapina, es el antipsicótico más comúnmente prescrito puesto que trata síntomas positivos, negativos y cognitivos (como el resto de segunda generación), pero además, también tiene efecto antidepressivo (Moller, 2005). A pesar de la mejora que conllevan estos fármacos con respecto a los de primera generación, siguen presentando efectos secundarios adversos, particularmente metabólicos, como obesidad y diabetes (Hirsch *et al.*, 2017).

Los fármacos antipsicóticos de tercera generación se caracterizan por su mecanismo de acción sobre el receptor D_2 , sobre el cual actúan como agonistas parciales en lugar de bloquearlo. Dentro de estos fármacos encontramos el aripiprazol, el brexpiprazol y la cariprazina. El aripiprazol también actúa como agonista parcial de los receptores $5-HT_{1A}$ y $5-HT_{2A}$, pero presenta mayor afinidad por el receptor D_2 . Se le conoce como estabilizador de la dopamina ya que en presencia de altas concentraciones extracelulares de dopamina compite por la unión al receptor, actuando como un antagonista; mientras que a bajas concentraciones extracelulares, se une al receptor y lo activa (Lieberman, 2004). La efectividad del aripiprazol como tratamiento de la esquizofrenia se puede comparar a la del haloperidol, además, a pesar de seguir presentando efectos secundarios adversos como los antipsicóticos de segunda generación, estos se manifiestan más leves, haciendo que el aripiprazol tenga una mejor tolerabilidad que el resto de antipsicóticos (Ribeiro *et al.*, 2018).

El avance en el estudio de los GPCRs y los nuevos modelos de activación del receptor, así como la compleja modulación de estos con compuestos alostéricos, agonistas inversos o compuestos sesgados que dan lugar a una selectividad funcional, y la dimerización y oligomerización de receptores, son el punto de mira para el estudio y desarrollo de futuros fármacos para el tratamiento de la esquizofrenia y otros trastornos mentales.

2.2 GPCRs involucrados en el tratamiento de la esquizofrenia.

Como se ha comentado anteriormente, la esquizofrenia es un trastorno mental en el cual están implicados numerosos neurotransmisores cuyos receptores suelen ser GPCRs. Además, los antipsicóticos que se utilizan para

el tratamiento de esta enfermedad tienen como diana principalmente el receptor D_2 y el receptor 5-HT_{2A} , aunque también pueden tener efecto sobre otros receptores de dopamina como D_3 o D_4 y de serotonina como el 5-HT_{1A} o el 5-HT_7 , así como receptores muscarínicos, receptores adrenérgicos o receptores histamínicos (Bymaster *et al.*, 2003; Meltzer and Massey, 2011; Mahmood, 2016; Maric *et al.*, 2016).

2.2.1 Receptores de dopamina D_2 .

La dopamina (3-hidroxitriptamina) fue descubierta hace más de 50 años como un metabolito del aminoácido tirosina (Carlsson and Waldeck, 1958). Este neurotransmisor catecolaminérgico está involucrado en numerosas funciones fisiológicas en el sistema nervioso central donde actúa a través de las vías dopaminérgicas del cerebro, que como se ha dicho anteriormente, son cuatro principalmente y son las más prominentes del cerebro. Algunas de estas funciones son el movimiento voluntario, la alimentación, el afecto y la atención, la memoria, el sueño y el aprendizaje. En la periferia también tiene funciones en la regulación del olfato, procesos retinales, regulación hormonal, funciones cardiovasculares, renales y del sistema inmune entre otras (Iversen and Iversen, 2007). Debido al elevado número de funciones en las que la dopamina está involucrada, también muchas disfunciones dopaminérgicas se han relacionado con múltiples enfermedades, sobre todo asociadas al sistema nervioso central como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, el trastorno por déficit de atención, la enfermedad de Huntington, el abuso y adicción de drogas, depresión y otros desórdenes somáticos como la hipertensión y la disfunción renal (Carlsson, 2001).

La dopamina se une y activa GPCRs pertenecientes a la familia de rodopsina o clase A y a los cuales se les denominan receptores de dopamina. Los receptores de dopamina son 5 (D_1 - D_5) y están divididos en dos grupos principales D_1 (en el que encontramos el receptor D_1 y D_5) y D_2 (en el que encontramos el receptor D_2 , D_3 y D_4) según la capacidad de estos receptores de modular la actividad de la adenilato ciclasa. Los receptores del grupo D_1 están acoplados a proteínas $G_{\alpha s}$ y por tanto activan la AC y producen el

aumento de AMPc y los receptores del grupo D₂ están acoplados a proteínas G_{αi} y por tanto inhiben la AC (Andersen *et al.*, 1990).

En humanos, el gen del receptor de dopamina D₂ se encuentra en el cromosoma 11q23.1 y tiene 6 intrones (**Figura 9**). Por *splicing* alternativo de 87 pares de bases situadas entre el intrón 4 y 5 se producen dos variantes principales del receptor D₂: D₂ largo (D_{2L}) o D₂ corto (D_{2S}), los cuales tienen 443 o 414 aminoácidos, respectivamente. Los 29 aminoácidos adicionales situados en el tercer bucle intracelular hacen que ambas variantes tengan distintas propiedades anatómicas, fisiológicas y farmacológicas. El D_{2S} se expresa más en neuronas presinápticas mientras que el D_{2L} está predominantemente en las neuronas postsinápticas (Giros *et al.*, 1989; De Mei *et al.*, 2009). El extremo amino terminal es similar en todos los tipos de receptores de dopamina, sin embargo, el extremo carboxilo es siete veces más largo en los receptores del grupo D₁ que en los receptores del grupo D₂ (Missale *et al.*, 1998).



Figura 9. Estructura cristalina del receptor D₂ unido a haloperidol (PDB 6LUQ) (L *et al.*, 2020).

Los niveles más altos de expresión del receptor D₂ en el cerebro se han encontrado en el estriado, el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio. También hay niveles significativos de este receptor en la sustancia negra, el

área ventral tegmental, el hipotálamo, zonas de la corteza, el septum, la amígdala y el hipocampo. Además, a nivel periférico este receptor se ha observado en retina y en la glándula pituitaria; y junto al resto de receptores de dopamina también se encuentra en el riñón, las glándulas adrenales, el tracto gastrointestinal, vasos sanguíneos y corazón (Missale *et al.*, 1998; Vallone, Picetti and Borrelli, 2000).

El receptor D₂ se encuentra tanto en neuronas presinápticas como postsinápticas, lo que hace que tenga funciones específicas según la localización. Una de las mayores implicaciones de la dopamina está relacionada con la locomoción, por ello, la activación presináptica de receptores D₂ disminuye la liberación de dopamina, dando lugar a una disminución de la actividad locomotora; mientras que la activación postsináptica estimula la locomoción. El hecho de que este receptor sea la diana de fármacos antipsicóticos, también lo ha relacionado con su implicación fundamental en desórdenes psiquiátricos. Fuera del sistema nervioso central, el receptor D₂ media la regulación de la secreción de prolactina en la glándula pituitaria, media la secreción de aldosterona en la glándula adrenal, así como la función renal, la regulación de la presión sanguínea y la movilidad gastrointestinal (Beaulieu and Gainetdinov, 2011).

Dentro del grupo de receptores D₂, los receptores presentan perfiles farmacológicos distintos, aunque a veces es difícil encontrar diferentes compuestos que sean selectivos para cada receptor, sobre todo en el caso del receptor D₂ y D₃. Tampoco hay compuestos que discriminen entre la variante larga y corta del receptor D₂. Todos comparten como agonista endógeno la dopamina, aunque tiene mayor afinidad por el receptor D₃ y D₄ que por el D₂. Además de la dopamina, los agonistas apomorfina y bromocriptina son más selectivos por el receptor D₂. En el caso de los antagonistas, el haloperidol y la espiperona son los que presentan una mayor afinidad por el receptor D₂, aunque también presentan actividad antagonista la sulpirida, la clozapina y la clorpromacina (Missale *et al.*, 1998).

El receptor D₂ está acoplado a la proteína G_{oi} que regula negativamente la producción de AMPc, dando lugar a la disminución de la actividad de PKA, la activación de canales de potasio y la modulación de otros canales iónicos. Se ha identificado que la activación de la proteína G_{oi} da lugar a la inhibición

de la AC5, mediante la activación del receptor D_2 en el estriado (Lee *et al.*, 2002). Como se comentado, la disminución del AMPc conlleva un descenso de la actividad de la PKA, la cual tiene varios sustratos que se ven afectados, como son la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), receptores ionotrópicos de glutamato, algunos canales iónicos y la fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc de 32 kDa (DARPP-32). Esta última proteína es un inhibidor potente de la proteína fosfatasa 1 (PP1) y es una de las más estudiadas en la vía de señalización de la dopamina ya que actúa como integrador y regulador de la plasticidad sináptica dependiente de dopamina en el estriado (Nair, Bhalla and Hellgren Kotaleski, 2016). Así mismo, la PKA también fosforila la proteína CREB en la serina 133 y se ha demostrado un aumento en la fosforilación de esta proteína al bloquear el receptor D_2 con diversos antagonistas específicos como el haloperidol (Pozzi *et al.*, 2003a)

Además de la vía de señalización canónica a través de la subunidad $G_{\alpha i}$, el receptor D_2 también puede señalizar a través de la subunidad $G_{\beta\gamma}$. A través de esta subunidad puede activar otras AC como la AC2; puede estimular MAP quinasas como la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK) que da lugar a la síntesis de AND y mitogénesis de muchos tipos celulares; aumenta la corriente de iones de K^+ en la mayoría de áreas cerebrales dando lugar a una disminución de la excitabilidad celular; en interneuronas colinérgica inhibe canales de Ca^{2+} tipo N, inhibiendo la liberación de acetilcolina; y también puede activar la PLC que en última instancia da lugar a la reducción de las corrientes de Ca^{2+} a través de canales de tipo L. La activación de PLC puede llevar también a la activación de CREB, DARPP-32 o ERK de manera independiente de PKA (**Figura 10**) (Neve, Seamans and Trantham-Davidson, 2004).

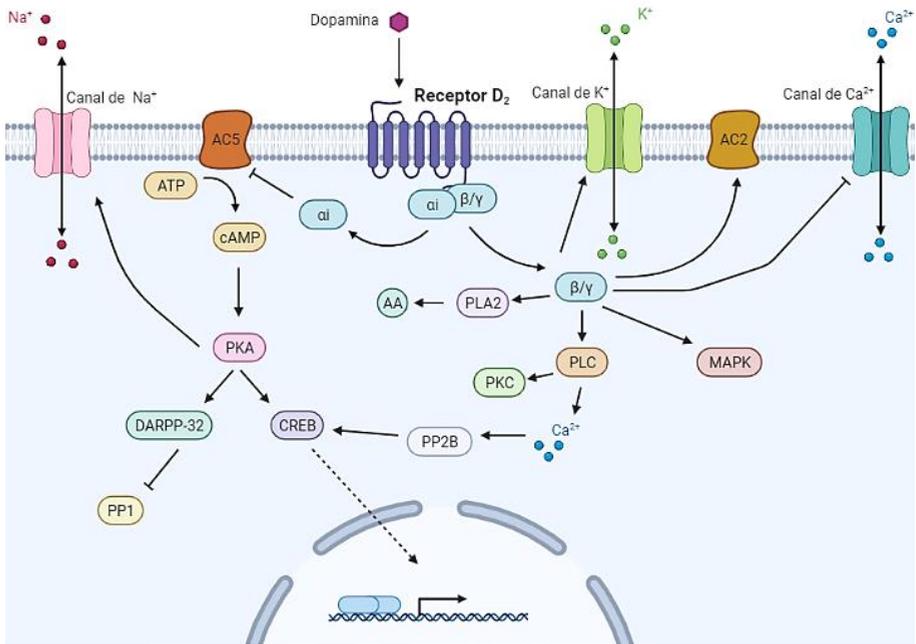


Figura 10. Vías de señalización del receptor D₂ de dopamina. Imagen creada por la doctoranda en Biorender.com.

La relación entre el receptor D₂ y la esquizofrenia se hizo evidente casi simultáneamente con el descubrimiento de los receptores de dopamina ya que se observó el efecto antipsicótico del haloperidol al unirse a este receptor en 1975. Todos los antipsicóticos, tanto típicos como atípicos, tienen afinidad por este receptor. Esto, sumado a la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia en la que se describe una hiperactividad dopaminérgica en la zona mesolímbica, hacen que el estudio de este receptor y sus ligandos sea de un alto interés para el tratamiento de la esquizofrenia (Seeman, 2006).

2.2.2 Receptores de serotonina 5-HT_{2A}.

La serotonina, 5-hidroxitriptamina (5-HT) es uno de los mensajeros químicos más estudiados debido al elevado número de procesos fisiológicos en los que interviene. Se sugirió su función como neurotransmisor en el sistema nervioso central puesto que se observó que se distribuía heterogéneamente por todo el cerebro (Amin, Crawford and Gaddum, 1954). La serotonina juega un papel importante en las funciones fisiológicas humanas a través de la interacción con 14 subtipos de receptores de serotonina, de los cuales 13 están acoplados a proteínas G y uno es un canal catiónico controlado por ligando (Berger, Gray and Roth, 2009). Algunas de las funciones fisiológicas en las que interviene la serotonina y sus receptores son el control de los ciclos de sueño y vigilia, locomoción, termorregulación, alimentación, dolor, migrañas, homeostasis, cognición y comportamiento sexual. Las alteraciones en el sistema serotoninérgico en el sistema nervioso central están implicadas en enfermedades neurodegenerativas, desórdenes psiquiátricos y control del estado de ánimo y emociones; también en enfermedades gastrointestinales, patologías cardiovasculares y de agregación plaquetaria.

Los receptores de serotonina, que pertenecen a la clase A o similares a Rodopsina de la clasificación de los GPCRs, se subdividen en 6 grupos, 5-HT₁ - 5-HT₇, siendo el 5-HT₃ la excepción ya que se corresponde con un canal iónico. A su vez, la familia de receptores 5-HT₁ tienen 5 subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}), la de 5-HT₂ tiene 3 subtipos (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}); y la de 5-HT₅ tiene 2 subtipos (5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}) (Humphrey, Hartig and Hoyer, 1993).

Los receptores de la familia 5-HT₂ comparte una alta homología en la secuencia (entre un 46-50% de similitud) y tienen vías de señalización similares. En particular, el receptor 5-HT_{2A} está formado por 471 aminoácidos y presenta varias glicosilaciones. En humanos, el gen de este receptor se encuentra en el cromosoma 13q14-q21 y tiene tres intrones (**Figura 11**). Se produce una variante truncada por *splicing* alternativo que se ha localizado en cerebro, pero no tiene diferencias funcionales o de unión a ligandos (Guest *et al.*, 2000). Este receptor está implicado en numerosas funciones biológicas como la contracción muscular, la división y

crecimiento celular, ya que posee actividad mitótica; y a nivel cerebral, está involucrado en varios procesos neurofisiológicos.

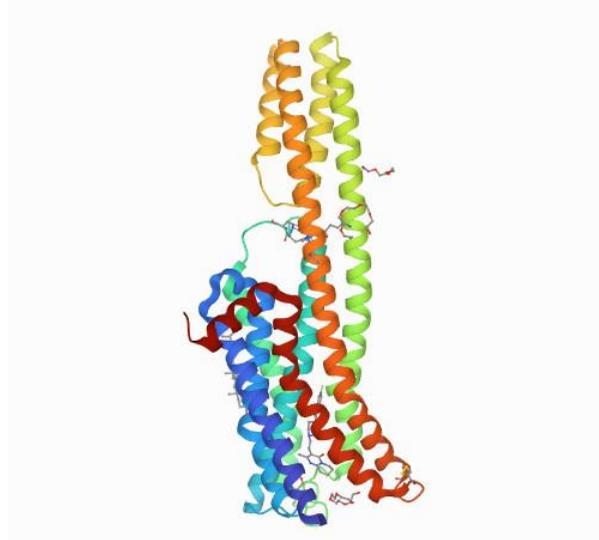


Figura 11. Estructura cristalina del receptor 5-HT_{2A} unido a risperidona (PDB 6A93) (Kimura *et al.*, 2019).

Los estudios con radioligandos específicos, hibridación in situ de ARN mensajero y RT-PCR han confirmado una distribución del receptor 5-HT_{2A} similar en el cerebro de diferentes especies de mamíferos. Principalmente, este se distribuye por la corteza cerebral (sobre todo en la lámina I y IV donde se expresa en neuronas piramidales e interneuronas), en la ínsula, algunos núcleos del tronco cefálico y en el sistema límbico. A nivel periférico se han encontrado receptores en células musculares lisas vasculares y gastrointestinales, en plaquetas y en la retina (Leysen, 2004).

Al tratarse de un receptor de serotonina, la serotonina tiene efecto agonista sobre este receptor, además se ha comprobado que al activar el receptor induce agregación plaquetaria en las plaquetas (De Clerck *et al.*, 1984). Además de este agonista endógeno, los agonistas que más utilizan para el estudio de los efectos funcionales de este receptor son el 4-iodo, 4-bromo o 4-metil 1(2,5 dimetoxifenil)-2-aminopropano, denominados DOI, DOB o DOM, respectivamente. Estos agonistas, al igual que la mescalina o el LSD que también actúan como agonistas de este receptor aunque no son

selectivos exclusivamente para él, tienen efectos alucinógenos, por lo que son buenas herramientas farmacológicas para el estudio del receptor pero no tienen ninguna aplicación clínica (Fiorella, Rabin and Winter, 1995). Por otro lado, los antagonistas de este receptor tienen efecto clínico en algunos de los síntomas de la esquizofrenia, de ahí que muchos de los antipsicóticos de segunda generación o atípicos tengan como diana este receptor, como la clozapina o la risperidona. La ketanserina se utiliza también como herramienta farmacológica de estudio siendo un antagonista específico (Leysen, 2004).

El receptor 5-HT_{2A} está acoplado a la proteína G_{αq} que de manera canónica activa la PLC, dando lugar a la hidrólisis de PIP₂ en DAG y IP₃. Esto lleva a un aumento en la acumulación de Ca²⁺ intracelular que promueve la activación de canales de calcio y de la PKC. Esta vía de señalización es la que se da de manera mayoritaria, pero se ha observado que este receptor puede inducir muchas vías diferentes dependiendo también del tipo celular. Por otro lado, se ha observado que algunos agonistas sesgados pueden activar la fosfolipasa A₂ (PLA₂) dando lugar a la liberación de ácido araquidónico (AA) mediado a través de la activación de la proteína G_{α12} y Rho y la activación de p38 en células NIH3T3 (Kurrasch-Orbaugh *et al.*, 2003).

En neuronas piramidales del córtex prefrontal, la estimulación del receptor 5-HT_{2A} promueve la inhibición del flujo de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje y reduce las corrientes persistentes de Na⁺, a través de la vía de señalización G_q/PLC/PKC, lo que puede modular negativamente la plasticidad sináptica de las dendritas.

Diferentes mecanismos de señalización intracelular pueden dar lugar a la activación de ERK en varios tejidos. En algunas neuronas, la activación del receptor media la activación de ERK independientemente de PLC y PKC, sino a través de vías de señalización dependiente de Ras y Raf y la activación de quinasas. La activación de ERK puede provocar cambios neuronales a largo plazo (**Figura 12**) (Quinn *et al.*, 2002).

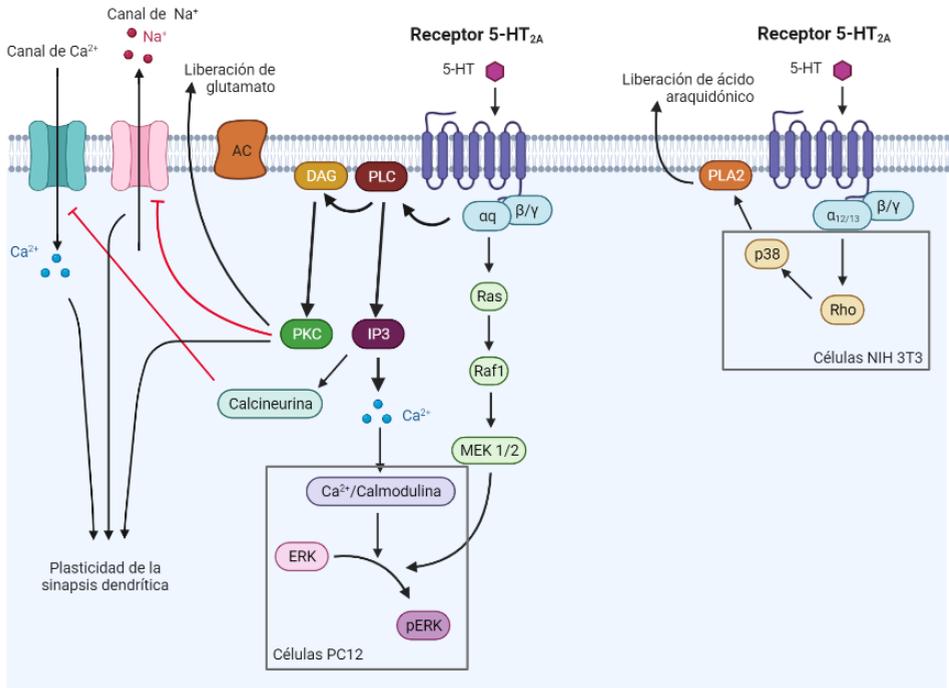


Figura 12. Vías de señalización del receptor 5-HT_{2A}. Imagen creada por la doctoranda en Biorender.com. Modificada de (Masson *et al.*, 2012).

La implicación del receptor 5-HT_{2A} en la esquizofrenia surgió a partir del efecto antipsicótico que presentaban algunos antagonistas de este receptor, tratando síntomas positivos y negativos. Esta relación con la esquizofrenia se ha corroborado gracias a varios estudios en los que se muestra una gran reducción de la unión al receptor 5-HT_{2A} por parte de ligandos específicos en el córtex prefrontal, tanto en tejido post mórtem de pacientes esquizofrénicos como en estudios in vivo (Rasmussen *et al.*, 2010; Selvaraj *et al.*, 2014).

2.2.3 Receptores de serotonina 5-HT₇.

Como se ha comentado anteriormente, el receptor de serotonina 5-HT₇ pertenece a la familia de los receptores de serotonina y es el que se identificó más recientemente dentro de la familia de GPCRs

serotoninérgicos. Este subtipo de receptor está implicado en numerosos procesos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso central, como el ritmo circadiano, el movimiento ocular en la fase REM del sueño, depresión, termorregulación, ansiedad, esquizofrenia, nocicepción, epilepsia y memoria.

Fue clonado por primera vez en 1993 (Lovenberg *et al.*, 1993). El gen se localiza en el cromosoma humano 10q21-q24 y contiene tres intrones por lo que el ARN mensajero puede sufrir *splicing* alternativos que dan lugar a tres variantes en humanos que se diferencian en la cola carboxilo terminal intracelular, 5-HT_{7a}, 5-HT_{7b} y 5-HT_{7d} (Heidmann *et al.*, 1997; Vanhoenacker, Haegeman and Leysen, 2000). Esto puede dar lugar a diferentes perfiles farmacológicos, sin embargo, no se han descrito variaciones en la cascada de transducción intracelular (**Figura 13**).

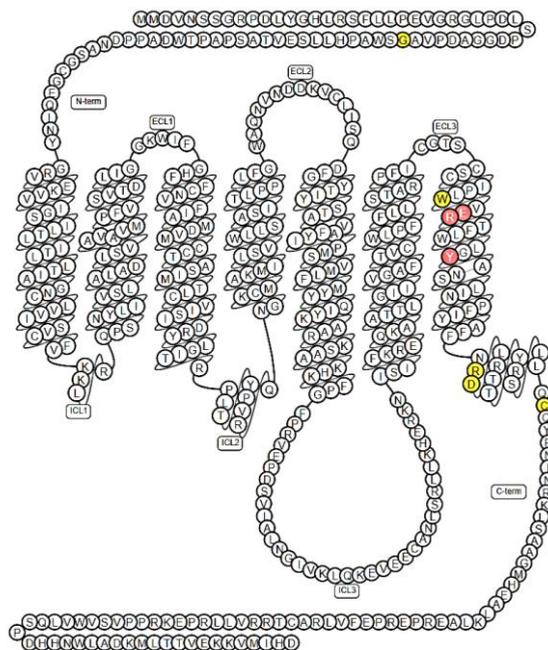


Figura 13. Estructura y secuencia aminoacídica del receptor 5-HT₇. En rosa se indican las mutaciones *in vitro* que reducen la unión o potencia de los ligandos en más de 5 veces; y en amarillo las mutaciones que no tienen efecto o el efecto que tienen es menor de 5 veces. Imagen obtenida de la base de datos de GPCRs (gpcrdb.com).

Este receptor se encuentra ampliamente distribuido por todo el sistema nervioso central y periférico mostrando una mayor expresión en el hipotálamo, tálamo, hipocampo y regiones de la corteza (Varnäs *et al.*, 2004). También se ha detectado en células del musculo liso cardiovasculares, gastrointestinales y del sistema reproductivo, donde este receptor tiene función relajante (Inoue *et al.*, 2003; Jähnichen, Glusa and Pertz, 2005; Janssen *et al.*, 2005).

Existen numerosos agonistas no selectivos de este receptor como la serotonina (5-HT), el carboxitriptamina (5-CT) y la 8-hidroxi-2-dipropilamino tetralina (8-OH-DPAT) que no presentan una afinidad muy alta por este (a excepción de la serotonina que presenta una $K_d = 2.9$ nM (Vanhoenacker, Haegeman and Leysen, 2000)), pero que se utilizaron en diversos ensayos para su estudio. Más recientemente, se identificaron agonistas selectivos para este receptor como AS-19, LP-211 y E-55888, así como numerosos antagonistas selectivos, como el compuesto SB-258719, SB-269970, SB656104 y JNJ-18038683 (Nikiforuk, 2015). Además, numerosos antipsicóticos como la risperidona, clozapina, lurasidona y amisulprida presentan afinidad por este receptor, al igual que compuestos alucinógenos como el LSD, pero no son selectivos de 5-HT₇.

El receptor 5-HT₇ está acoplado a una proteína $G_{\alpha s}$ de modo que su estimulación provoca la activación de la adenilato ciclasa que conlleva un aumento del AMPc. La coexpresión de varias isoformas de AC con el receptor 5-HT₇ humano en células HEK293 ha demostrado que la activación de $G_{\alpha s}$ activa la AC5. También se ha observado una activación de la AC1 y AC8 que son insensibles a $G_{\alpha s}$, pero sensibles a calcio/calmodulina (Ca^{2+} /CaM). De hecho, la activación del receptor conlleva el aumento de Ca^{2+} independiente de PIP2 o PKC, a través de la actividad de AC1 y AC8. Estos subtipos de AC son específicos de células neuronales y se expresan en áreas como el hipotálamo o el hipocampo, donde también se localiza el receptor 5-HT₇ (Baker *et al.*, 1998). El aumento de AMPc tras la activación del receptor provoca por un lado la activación de PKA que fosforila a CREB (proteína de unión al factor de transcripción CRE); y por otro lado la despolarización de las neuronas, de manera independiente a la activación de PKA, aumentando la corriente catiónica de manera no selectiva o a través de canales de potasio (Bonsi *et al.*, 2007). En células HEK el AMPc y el Ca^{2+}

contribuyen a la activación de la vía de ERK a través de factores de intercambio de nucleótidos de guanina, Ras. En cultivos de neuronas hipocámpales transfretadas con el receptor 5-HT₇, también se activa la vía de señalización de ERK a través de factores de intercambio de guanina Epac, más que a través de PKA (Lin *et al.*, 2003).

Además, se ha observado que el receptor puede acoplarse también a la proteína G₁₂ en células fibroblásticas NIH3T3 desencadenando una señalización a través de la GTPasa RhoA que resulta en la modificación de la morfología celular e induce la formación de filopodios (**Figura 14**) (Kvachnina *et al.*, 2005).

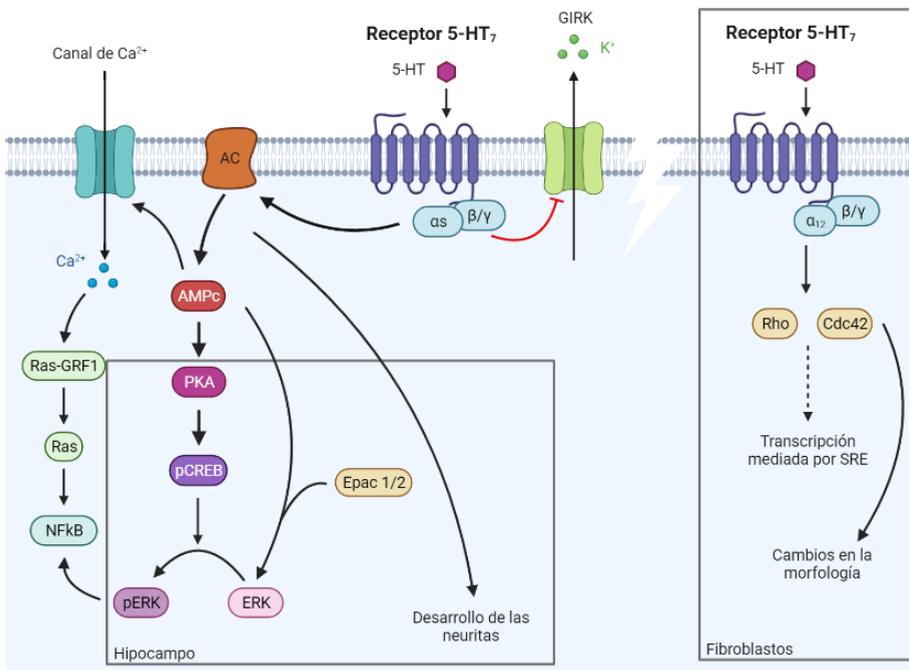


Figura 14. Vías de señalización del receptor 5-HT₇. Imagen creada por la doctoranda en Biorender.com. Modificada de (Masson *et al.*, 2012).

La implicación del receptor 5-HT₇ en la esquizofrenia ya se observó desde que se comprobó que este receptor es diana de antipsicóticos tanto típicos como atípicos por lo que parte de los efectos de estos fármacos pueden estar mediados por esta vía (Roth *et al.*, 1994). Se ha demostrado

que la risperidona, antipsicótico de segunda generación, se une de manera pseudo irreversible al receptor 5-HT₇ inactivándolo. Concentraciones elevadas de este compuesto inhiben por completo la funcionalidad del receptor ocupando solo el 50% de los receptores 5-HT₇, lo que podría ser debido a una posible dimerización del receptor (Smith *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 2009). Asimismo, algunos antagonistas del receptor NMDA, como la ketamina, que promueven síntomas positivos y negativos, son bloqueados significativamente por el antagonista específico del receptor 5-HT₇, el compuesto SB-269970 disminuyendo la hiperactividad en ratas y ratones (Galici *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2012). El bloqueo farmacológico del receptor parece tener implicaciones terapéuticas en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos a través del efecto de numerosos antipsicóticos (Nikiforuk, 2015).

Además, algunos estudios han demostrado la disminución de la expresión del receptor 5-HT₇ y la cantidad de ARN mensajero en tejido cerebral del córtex prefrontal de pacientes esquizofrénicos post mórtem, lo que puede sugerir una desregulación a largo plazo de este receptor en pacientes con esquizofrenia crónica (East *et al.*, 2002). Este receptor juega un papel importante en la regulación sináptica cortical, por lo que podría contribuir al mal funcionamiento del corte prefrontal, seguida de síntomas cognitivos que se muestra en los pacientes esquizofrénicos. Diversos estudios han demostrado los efectos pro cognitivos del antagonismo del receptor 5-HT₇ en modelos animales de esquizofrenia, específicamente a nivel del córtex prefrontal.(Matthys *et al.*, 2011).

3. Oligomerización de GPCRs.

3.1 Aspectos generales.

Como se ha descrito anteriormente, los GPCRs son proteínas de membrana que transforman la unión de ligandos extracelulares en una respuesta intracelular. Estos receptores tienen diversos estados de activación, que dan lugar a cambios conformacionales que permiten la interacción con distintos efectores a nivel intracelular. Además, existen compuestos sesgados con capacidad de señalar preferentemente por unas

u otras vías, y compuestos alostéricos que modulan los estados de activación del receptor.

Sumado a esta variabilidad en la señalización de los GPCRs a finales de los años 70 se introdujo la idea de que estos receptores no actuaban exclusivamente como monómeros, sino que también podían funcionar como dímeros y oligómeros (Limbird, Meyts and Lefkowitz, 1975). Estos complejos oligoméricos pueden interactuar con distintos ligandos y pueden acoplarse a distintos efectores por lo que dan lugar a una señalización diferente de la correspondiente a sus entidades monoméricas. En la actualidad, con el desarrollo de diversas técnicas biológicas como ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia o bioluminiscencia (FRET o BRET, respectivamente), la microscopía de molécula-única (que permite visualizar procesos de dimerización de GPCRs a tiempo real), ensayos de biología molécula y co-inmunoprecipitación, y ensayos de proximidad de ligación *in situ* (P-LISA) han permitido ampliar el conocimiento en el campo de la dimerización u oligomerización de GPCRs (Figura 15) (Wang, Qiao and Li, 2018).

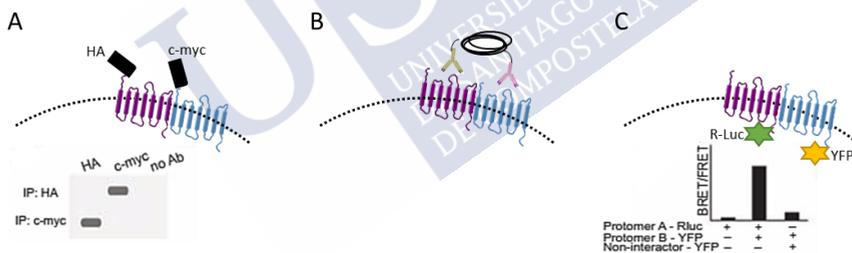


Figura 15. Ejemplo de técnicas usadas para el estudio de dimerización de GPCRs. **A)** Ensayos de co-inmunoprecipitación. Se utilizan anticuerpos contra las proteínas de interés o contra epítomos comunes como HA o c-myc con el fin de comprobar si esas proteínas interactúan físicamente. Brevemente, un protómero se inmunoprecipita, y el otro protómero se revela por *western blot*. **B)** Ensayo de ligación por proximidad. Los anticuerpos van dirigidos frente al receptor o a epítomos comunes. Se suelen utilizar anticuerpos secundarios que reconocen los primarios y que están conjugados con fluoróforos de manera que si están próximos se detecta la señal. **C)** Ensayos de BRET o FRET. Basados en la física de la energía de transferencia de resonancia, si dos proteínas se encuentran a una distancia de 10 nm se produce una transferencia de energía entre el fluoróforo donante (Rluc) unido a un receptor, y el aceptor (YFP) unido al otro receptor. Imagen realizada por la doctoranda modificada de (Bourque *et al.*, 2020).

Se han estudiado las interacciones en la membrana entre diferentes GPCRs a la hora de formar dímeros u oligómeros, y aunque la oligomerización en la clase C de GPCRs es habitual, todavía hay cierta resistencia a aceptar la oligomerización de receptores en la clase A y B (Ferré, 2015). Dependiendo del número y naturaleza de GPCRs que forman los complejos se puede diferenciar entre homo (cuando los receptores son del mismo tipo) o hetero (cuando los receptores son diferentes) que forman dímeros, o complejos de mayor número como trímeros o tetrámeros.

Gracias a los estudios cristalográficos se han descrito las interfaces de unión entre diferentes dímeros. Así, se pueden observar dos interfaces principales que se mantienen entre los diferentes dímeros: 1) una que involucra los dominios transmembrana TM1, TM2 y la hélice 8 (H8); 2) y otra que envuelve los dominios TM4, TM5 e ICL2. De la primera interfaz la mayoría de los residuos que intervienen en las interacciones hidrofóbicas y de fuerzas de *van der Waals* pertenecen al TM1. También pueden formarse puentes de hidrógeno. De la segunda interfaz los residuos que intervienen en la unión pertenecen principalmente a los dominios TM4 y TM5, aunque en algunos GPCRs predominan los residuos de los TM5 y TM6 (Syrovatkina *et al.*, 2016).

Es importante diferenciar entre los cambios en la señalización intracelular derivados de un *crosstalk* entre dos o más receptores y el alosterismo mediado por la unión física de un monómero con otro o con varios. El *crosstalk* funcional o señalización cruzada, puede ocurrir a diferentes niveles de la cascada intracelular y puede depender o no de la oligomerización física de los receptores. La habilidad de un ligando de actuar sobre un GPCR y modular la función de un segundo GPCR no depende exclusivamente de que estos receptores estén formando complejos. Por ello, se diferencia entre la señalización canónica a través de los receptores monoméricos y la señalización cruzada o *crosstalk* entre dos o más receptores que pueden estar, o no, formando oligómeros (**Figura 16**) (Kamal *et al.*, 2011).

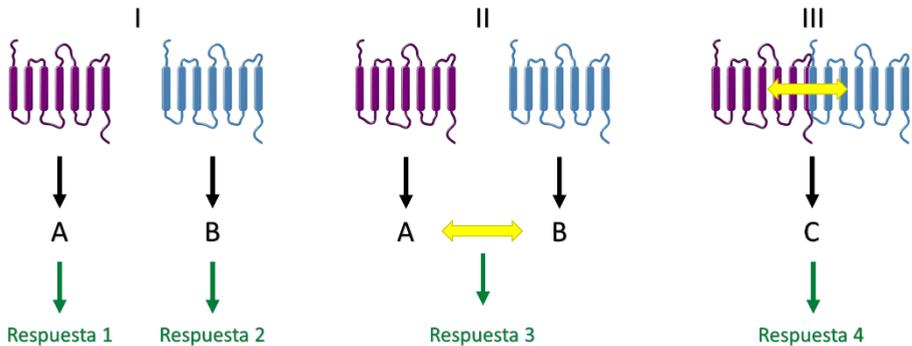


Figura 16. Diferentes interacciones entre GPCRs. I) Señalización a través de GPCRs monoméricos. II) Señalización cruzada o *crosstalk* (flecha amarilla) entre dos GPCRs monoméricos. III) Señalización cruzada o *crosstalk* (flecha amarilla) entre dos GPCRs diméricos. Imagen realizada por la doctoranda.

Distinguir entre la señalización cruzada y el alosterismo provocado por la interacción física de los receptores puede ser ambiguo dependiendo el caso concreto de oligomerización, además puede ocurrir que ambos efectos se produzcan simultáneamente.

Cuando hablamos de dimerización u oligomerización de receptores tenemos que tener en cuenta que la transducción intracelular puede ocurrir a través de uno de los protómeros del complejo (**Figura 17A y B**), a través de todos los protómeros (**Figura 17C**), o bien que la transducción de la señal a través de un protómero se vea influenciada por el resto de protómeros del complejo (**Figura 17D y E**), lo que se entiende como alosterismo entre GPCRs o alosterismo lateral (Kenakin and Miller, 2010).

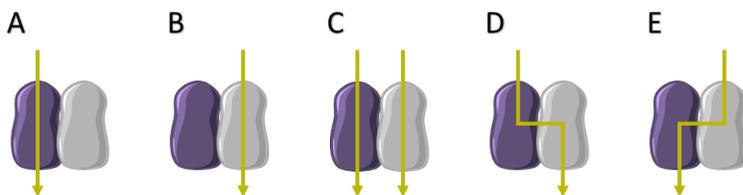


Figura 17. Diferentes vías de señalización a través de complejos diméricos. Imagen realizada por la doctoranda.

En algunos casos, ciertos GPCRs tienen que agruparse en dímeros o complejos mayores para poder señalizar ya que, si no, no son funcionales, como es el caso de los receptores GABA (Papasergi-Scott *et al.*, 2020). En el caso de los oligómeros “no obligatorios”, en los cuales se ha observado que los receptores pueden señalizar de manera monomérica, es más complejo encontrar un significado para la formación de estos. Cuando las especies de los receptores que se unen son distintas, es decir, se producen heterómeros puede, explicarse porque poseen distintas propiedades funcionales que los monómeros. La formación de oligómeros funcionales ofrece la posibilidad de regulación alostérica de un protómero sobre los demás. Como se ha comentado anteriormente, los GPCRs pueden comportarse como proteínas alostéricas, de manera que cuando forman dímeros o complejos mayores pueden influir en la señalización intracelular. Esta modulación alostérica puede afectar de múltiples formas, dando lugar a efectos fenotípicos característicos para cada complejo dimérico:

- 1) La unión de dos o más receptores puede alterar la capacidad de unión de los ligandos al sitio de unión ortostérico cambiando la afinidad que presentan por cada monómero cada uno de sus ligandos (**Figura 18A**).
- 2) La dimerización u oligomerización de los receptores puede modular positiva o negativamente las vías de señalización intracelular de alguno de los protómeros (**Figura 18B**).
- 3) La unión de dos o más receptores puede llevar a cambios conformacionales en los monómeros que alteren la interfaz de acoplamiento a las proteínas efectoras intracelulares, como las proteínas G, modificando la respuesta biológica (**Figura 18C**).
- 4) La interacción física de los receptores puede modificar también los patrones de internalización, tráfico y degradación de los respectivos a las entidades monoméricas (**Figura 18D**).

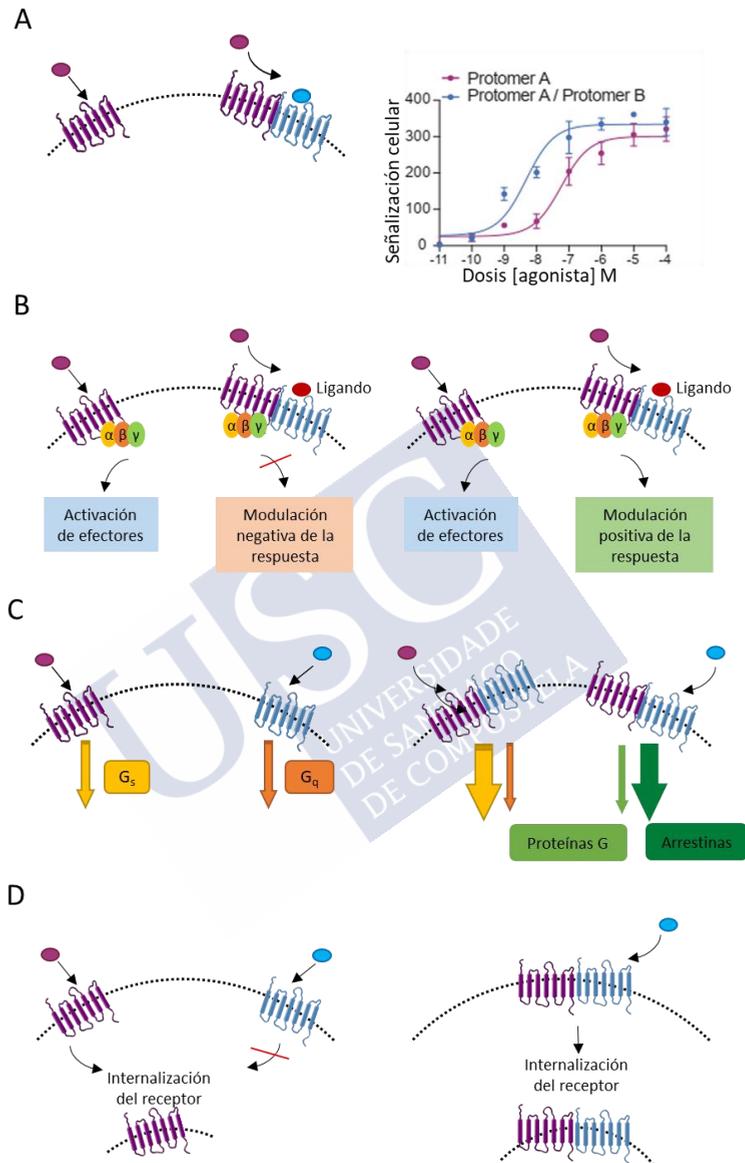


Figura 18. Diferentes modificaciones alostéricas resultado de la oligomerización de los GPCRs. A) Alteraciones en la afinidad de unión de los ligandos. B) Modulación de la señalización intracelular. C) Señalización sesgada a diferentes vías. D) Alteraciones en los patrones de internalización. Imagen realizada por la doctoranda modificada de (Bourque *et al.*, 2020)

Como se ha comentado, la oligomerización de GPCRs puede llevar a perfiles de señalización muy diferentes a los que tienen los receptores individualmente. La superficie de unión a ligandos varía, dando lugar a múltiples combinaciones posibles de bolsillos de unión donde interaccionar con lo ligandos. Las diversas interacciones alostéricas que pueden suceder en estas situaciones provocan una alteración de la farmacología de estos complejos. La formación de dímeros y oligómeros puede alterar la eficiencia de los fármacos y compuestos alostéricos que modulan la señalización positiva o negativamente.

Se ha comprobado que algunos dímeros tienen funciones farmacológicas diferentes a los monómeros y son de gran relevancia a la hora de desarrollar futuros fármacos. Por ejemplo, la unión de agonistas o antagonistas al receptor β_2 adrenérgico o al receptor de oxitocina OT, cuando estos se encuentran formando un heterodímero, da lugar a la activación de ERK (Wrzal *et al.*, 2012). También ocurre con el heterodímero CB_1/CB_2 , en los cuales se reduce la señal de ERK a través de AMPc cuando se unen antagonistas a los receptores, que se conoce como cross-antagonismo, y tiene mucha relevancia en el tratamiento del alzhéimer (Navarro *et al.*, 2018). Por otro lado, el heterodímero 5-HT_{1A}/5-HT₇ ha permitido demostrar que la dimerización de los receptores es dinámica, y que fluctúa en relación a la expresión de los monómeros en cada momento de maduración celular y tipo celular. Esto tiene relevancia a nivel a nivel cerebral, donde las neuronas más inmaduras expresan un mayor porcentaje del heterodímero, que da lugar a una supresión de la señalización a través de G_i mediada por el receptor 5-HT_{1A}; sin embargo, a medida que se produce la maduración neuronal disminuye la expresión del receptor 5-HT₇ y el receptor 5HT_{1A} forma homodímeros que presentan una farmacología diferente a la del heterodímero (Prasad, Ponimaskin and Zeug, 2019). Asimismo, la selectividad funcional que presentan los fármacos antipsicóticos típicos y atípicos sobre el receptor 5-HT_{2A} se ha asociado a procesos de dimerización de este receptor (Brea *et al.*, 2009).

3.2 Oligómeros relevantes en el sistema nervioso central.

Como se ha comentado anteriormente, más de la mitad de los GPCRs no sensoriales se expresan en el sistema nervioso central, y cerca del 30%

de los fármacos comercializados frente a GPCRs están destinados al tratamiento de desórdenes mentales. Es por ello que se está empezando a considerar que la oligomerización de los GPCRs tiene un alto impacto en las alteraciones neurológicas y por tanto su estudio es relevante a la hora de desarrollar nuevos tratamientos.

Se han descrito múltiples hetero- y homodímeros en el sistema nervioso central sobre todo de las familias de receptores de glutamato, adenosina, dopamina, serotonina y cannabinoides:

- **Receptores opiáceos y de cannabinoides.**

Los opiáceos y cannabinoides se usan para el tratamiento del dolor neuropático, y los receptores diana de estos fármacos presentan diversas similitudes en cuanto a anatomía y comportamiento. Se han descrito heterodímeros entre el receptor CB₁ y los receptores opioides κ O, δ O o μ O en los que se ha demostrado una potenciación del 9-tetrahidrocannabinol en el efecto opiáceo de la morfina en modelos animales (Cichewicz, 2004).

Además, también se han descrito heterodímeros entre receptores opioides y receptores de quimioquinas, como el CXCR₄ que forma dímeros con κ OP y δ OP; o el CCR₅ que dimeriza con μ OP (Chen *et al.*, 2004). La activación de CXCR₄ lleva a una disminución del efecto analgésico *in vivo* (Finley *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que los receptores de cannabinoides como el CB₁ forman dímeros con receptores de dopamina como el D₂ *in vitro*. En células HeK293 y cultivo de neuronas primarias del estriado se ha demostrado una señalización preferente a través de G_s y no G_i al co-estimular ambos receptores (Kearn *et al.*, 2005). Por otro lado, también se ha demostrado la formación de heterodímeros CB₁/A_{2A} *in vitro* e *in vivo*, dando lugar a un *crossstalk* funcional entre ambos receptores, mediando efectos motores (Carriba *et al.*, 2007).

- **Receptores de adenosina y glutamato.**

Los receptores de adenosina se expresan por todo el cuerpo y están implicados en diversos procesos fisiológicos y patológicos no solo a nivel neurológico. Se ha identificado la heterodimerización de los receptores A₁ y A_{2A} *in vitro* e *in vivo*, y un *crossstalk* funcional entre ellos que provoca una

disminución de la afinidad de los agonistas de A_1 cuando se activa el receptor A_{2A} , que puede jugar un papel en la tolerancia a los efectos psicoestimulantes de la cafeína (Ciruela *et al.*, 2006).

Los receptores metabotrópicos de glutamato también suelen formar homodímeros y heterodímeros con la combinación de los diferentes subtipos de receptores que forman parte de esta familia. Además, se ha identificado el heterodímero $A_1/mGlu_{1\alpha}$ en células HEK293 y sinaptosomas del cerebelo de rata y se ha sugerido su implicación de la neuroprotección, siendo potencial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el alzhéimer (Ciruela *et al.*, 2001). También se ha identificado la interacción física entre el receptor A_{2A} y $mGlu_5$ *in vitro*, e *in vivo* se ha demostrado que los efectos anti-parkinsonianos de los antagonistas de $mGlu_5$ se ven potenciados al antagonizar el receptor A_{2A} (Kachroo *et al.*, 2005).

- **Receptores GABAérgicos.**

Los receptores $GABA_B$ son el ejemplo más representativo y mejor estudiado de heterodimerización de receptores de manera obligada, ya que son necesarias las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ para que el receptor sea funcional. El receptor $GABA_{B1}$ contiene el bolsillo de unión a ligandos, mientras que el receptor $GABA_{B2}$ se acopla a la proteína G para transducir la señal (Marshall *et al.*, 1999).

También se ha observado que el receptor $GABA_{B2}$ interacciona física y funcionalmente con el receptor muscarínico M_2 , ambos expresados en el córtex somatosensorial, y que el receptor $GABA_{B1}$ forma heterodímeros con el receptor sensible a calcio CaS en neuronas del hipocampo (Chang *et al.*, 2007; Boyer *et al.*, 2009).

- **Receptores dopaminérgicos.**

Se han descrito numerosos ejemplos de heterodimerización entre receptores de dopamina, tanto de la misma familia como de otras, y la implicación en patología neurológicas como el Párkinson, discinesia o esquizofrenia (Missale *et al.*, 2010). El heterodímero D_1/D_2 se ha descrito *in vivo* y se ha observado que es capaz de señalizar a través de proteína G_q movilizándolo lo que puede contribuir a la plasticidad sináptica (Lee *et*

al., 2004). También se ha demostrado que este complejo puede unirse al receptor de histamina H_3 indicando la implicación postsináptica de este receptor en la modulación de la transmisión dopaminérgica. El receptor D_1 también forma heterodímeros con el receptor D_3 (Hounsou *et al.*, 2015).

El receptor D_2 , por su parte, también forma otros heterodímeros con múltiples receptores de distintos tipos, por ejemplo, el receptor de somatostatina SST_2 (ambos se co-localizan en el córtex, sustancia negra y estriado) (Baragli *et al.*, 2007); el receptor de prostaglandinas EP_1 (Kitaoka *et al.*, 2007); o el receptor de adenosina A_{2A} (con el cual se han descrito complejos en el estriado) (Canals *et al.*, 2003).

- **Receptores serotoninérgicos.**

Los receptores de serotonina son una de las familias más amplias de GPCRs y están implicados en numerosas enfermedades del sistema nervioso central como la depresión, la ansiedad o la esquizofrenia. Se han observado numerosos complejos entre receptores de serotonina. La mayoría de los receptores $5-HT_2$ forman homodímeros entre ellos, además también se han observado heterodímeros entre los subtipos $2A/2B$, $2A/2C$ y $2B/2C$. Por otro lado, se ha descrito el heterodímero $5-HT_{1A}/5-HT_7$ en células de neuroblastoma; y el heterodímero $5-HT_{1A}/5-HT_{2A}$ en células piramidales en el hipocampo de ratas. En ambos casos parece que los heterodímeros llevan a una señalización asimétrica de unas vías efectoras sobre otras (Maroteaux, Béchade and Roumier, 2019a).

El receptor $5-HT_{1A}$ dimeriza también con el receptor opioide μO y con el receptor D_2 de dopamina, pudiendo ser regulado diferencialmente por distintos antipsicóticos (Szlachta *et al.*, 2018).

El receptor $5-HT_{2A}$ junto con el receptor metabotrópico de glutamato $mGlu_2$ forma un heterodímero que juega un papel importante en la ansiedad y enfermedades psicóticas. Ambos receptores son capaces de aumentar o disminuir la afinidad de los ligandos cuando son activados con sus agonistas, hasta llegar a un equilibrio entre las vías de señalización G_i/G_q (González-Maeso *et al.*, 2008).

Asimismo, el receptor 5-HT_{2A} forma heterodímeros con el receptor de dopamina D₂ convirtiéndolos en una diana interesante para el tratamiento de la esquizofrenia con antipsicóticos.

3.2.1 Heterodímero D₂/5-HT_{2A}.

Los receptores D₂ y 5-HT_{2A} están implicados y juegan un papel fundamental en el efecto de los fármacos antipsicóticos y, por tanto, en el tratamiento de la esquizofrenia y otros desórdenes mentales. El efecto del antagonismo de estos receptores en los síntomas psicóticos y la co-localización de los mismos en neuronas dopaminérgicas llevó a la motivación de estudiar la heterodimerización de estos receptores. Diversos estudios muestran que estos receptores se expresan en neuronas dopaminérgicas en el área central tegmental del mesencéfalo, en la pars compacta de la sustancia negra, en el núcleo arqueado del hipotálamo y el córtex prefrontal (Fuxe *et al.*, 2014).

En el año 2010 se describió por primera vez mediante técnicas de BRET (transferencia de energía de resonancia bioluminiscente) la existencia del heterodímero funcional en células co-transfectadas (Borroto-Escuela *et al.*, 2010). También en el mismo año se demostró mediante el empleo de técnicas de espectroscopia fluorescente y microscopia fluorescente a tiempo real basadas en FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescente) la presencia de este heterodímero en células HEK293 co-transfectadas (Łukasiewicz *et al.*, 2010). En este estudio también se describió la interacción entre ambos receptores, sugiriendo la implicación de los residuos básicos de arginina del IC₃ del receptor D₂ y los residuos de ácido glutámico de la cola del carboxilo terminar del receptor 5-HT_{2A} en la formación del heterodímero. Es interesante destacar que el mutante del receptor 5-HT_{2A} H452Y, cuyo polimorfismo está asociado en humanos a la resistencia del tratamiento con el antipsicótico atípico, clozapina, tiene menos capacidad de dimerizar con el receptor D₂ que el receptor 5-HT_{2A} salvaje (Łukasiewicz *et al.*, 2011).

La formación de complejos diméricos D₂/5-HT_{2A} en el cerebro humano se observó unos años más tarde mediante ensayos de proximidad de

ligación (PLA) en zonas del estriado dorsal y núcleo accumbens (Borrotto-Escuela *et al.*, 2013).

La señalización intracelular del receptor 5-HT_{2A} está ligada a la proteína G_q que activa la producción de inositol fosfato y la movilización de calcio; mientras que el receptor D₂ se acopla a la proteína G_i inhibiendo la producción de AMPc (**Figura 19**). Los diversos estudios funcionales llevados a cabo con el heterodímero D₂/5-HT_{2A} han generado resultados variados y a veces contradictorios.

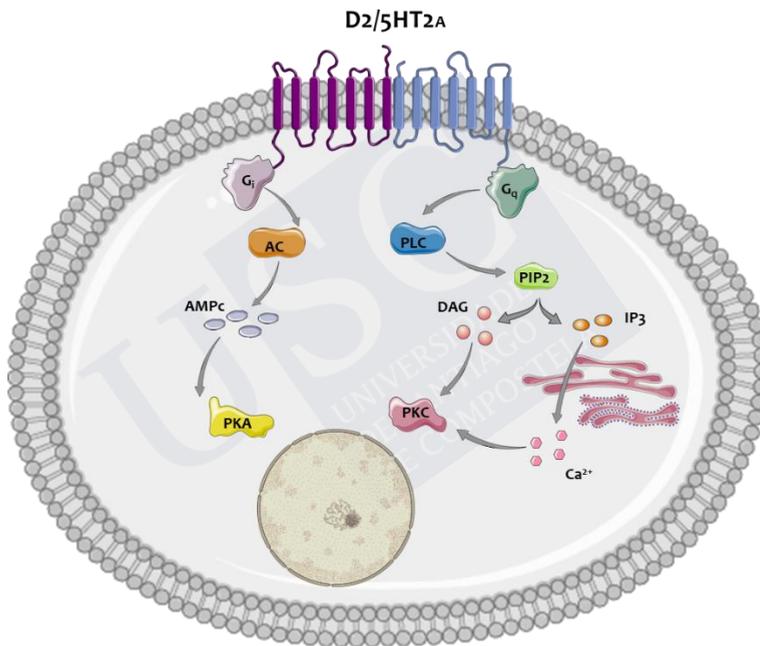


Figura 19. Vías de señalización canónicas del heterodímero D₂/5-HT_{2A}. Imagen realizada por la doctoranda.

Por un lado, se ha descrito que la expresión del receptor D₂ aumenta la eficacia del agonista alucinógeno (\pm) DOI, pero no la serotonina, para señalizar a través de la vía G_q del receptor 5-HT_{2A}. Esto puede demostrar que el *crossstalk* entre ambos receptores ocurre por una estabilización de la conformación del receptor 5-HT_{2A} alterada por el receptor D₂ que se comporta de manera alostérica. Además, la activación del receptor D₂ con

su agonista específico quinpirol, promueve una mayor unión del agonista alucinógeno (\pm) DOI a su receptor (**Figura 20**) (Albizu *et al.*, 2011).

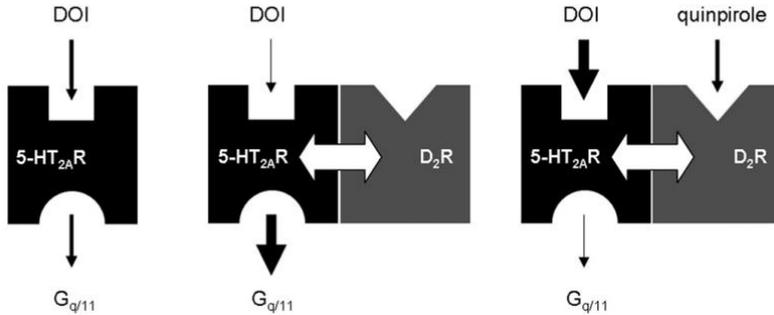


Figura 20. Modelos de *crossstalk* del heterodímero D₂/5-HT_{2A} según Albizu y colaboradores. Con permiso de *Elsevier* (Albizu *et al.*, 2011).

Borroto-Escuela y colaboradores comprobaron que la activación del receptor D₂ con quinpirol provoca un aumento de la potenciación de la vía de señalización G_q por los agonistas 5-HT y TCB2 mediado por receptor 5-HT_{2A}. Sin embargo, la serotonina y el agonista específico de 5-HT_{2A}, TCB2, producen una neutralización del efecto activador del agonista quinpirol en el receptor D₂ mediante ensayos del gen reportero de CRE-luciferasa en células HEK293 (Borroto-Escuela *et al.*, 2010). Por el contrario, los agonistas alucinógenos del receptor 5-HT_{2A}, LSD y (\pm) DOI, en concentraciones del rango nanomolar, producen un aumento del reconocimiento y la señalización a través del receptor D₂ por sus agonistas (Borroto-Escuela *et al.*, 2014). Los efectos psicóticos de los agonistas alucinógenos del receptor 5-HT_{2A} pueden estar involucrados en la potenciación de la señal del protómero D₂ del heterodímero D₂/5-HT_{2A} en el estriado ventral. Esto también da un nuevo enfoque al entendimiento del mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos atípicos.

El heterodímero D₂/5-HT_{2A} es un ejemplo de la regulación cruzada asimétrica y dependiente de ligando, en la que se produce una transactivación del receptor 5-HT_{2A} por los agonistas del receptor D₂, y una transinhibición del receptor D₂ por algunos agonistas del receptor 5-HT_{2A} (Maroteaux, Béchade and Roumier, 2019b).

En estudios previos realizados en el grupo de investigación al que pertenece la doctoranda, se caracterizó farmacológicamente el heterodímero $D_2/5\text{-HT}_{2A}$ en células HEK293 que coexpresan ambos receptores.

Se comprobó, al igual que en estudios de Albizu y colaboradores, que la expresión del receptor D_2 aumenta la eficacia del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm) DOI para la producción de inositol fosfato a través de la vía de señalización G_q , mostrando un efecto alostérico positivo; mientras que provocó una reducción del efecto antagonista del aripiprazol sobre el receptor 5-HT_{2A} , mostrando un efecto alostérico negativo. Asimismo, la coexpresión con el receptor 5-HT_{2A} produjo un aumento de la afinidad de la clozapina por el receptor D_2 . Además, la activación del receptor D_2 con su agonista endógeno dopamina, no modificó la potencia y eficacia de los agonistas o antagonistas del receptor 5-HT_{2A} ; pero el bloqueo del receptor con sulpirida, antagonista específico, disminuyó la capacidad de (\pm) DOI de producir especies de inositol fosfato a través del receptor 5-HT_{2A} .

El principal hallazgo fue que la activación del receptor 5-HT_{2A} por el agonista alucinógeno (\pm) DOI modificó la señalización de la dopamina a través del receptor D_2 , de manera que la dopamina tiene una menor eficacia para activar el receptor, sin variar la capacidad de esta de unirse a él, sugiriéndose que la modulación alostérica que provoca el (\pm) DOI tiene que ser a nivel de la señalización intracelular. El (\pm) DOI también moduló el efecto de los antipsicóticos sobre el receptor D_2 , sugiriendo una modulación alostérica tras la activación del receptor 5-HT_{2A} que provoca unos perfiles de actuación de los antipsicóticos típicos característicos y diferentes a los perfiles de los antipsicóticos atípicos. El bloqueo con ketanserina del receptor 5-HT_{2A} también provocó una reducción de la eficacia de la dopamina para activar el receptor D_2 , pero no tuvo efecto en el antagonismo de los antipsicóticos en este receptor.





ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



ANTECEDENTES

- La esquizofrenia es un trastorno mental severo que afecta al 1% de la población. Además del impacto social y económico de esta enfermedad, las necesidades médicas no están cubiertas ya que un porcentaje significativo de los pacientes no responde bien a los tratamientos disponibles (Dold and Leucht, 2014).
- La fisiopatología de esta enfermedad no está bien definida, pero sí están descritos múltiples factores genéticos y ambientales que pueden influir en su desarrollo. Asimismo, varias vías neuronales están descritas en relación con en la esquizofrenia, por lo que sus neurotransmisores y receptores, mayoritariamente GPCRs, están implicados en su tratamiento farmacológico.
- Los fármacos antipsicóticos disponibles para su tratamiento farmacológico muestran una alta afinidad por los receptores de dopamina D_2 (antipsicóticos típicos, que se comportan como antagonistas o agonistas parciales de este receptor) o una afinidad combinada junto con los receptores $5-HT_{2A}$ de serotonina, siendo incluso algo mayor por estos últimos (antipsicóticos atípicos) (Meltzer, Matsubara and Lee, 1989).
- Los receptores D_2 y $5-HT_{2A}$ forman entre sí complejos proteicos cuaternarios heterodiméricos funcionales tanto en células transfectadas (Borroto-Escuela *et al.*, 2010; Łukasiewicz *et al.*, 2010) como en zonas del estriado dorsal y núcleo accumbens del cerebro humano (Borroto-Escuela *et al.*, 2013).
- Existen indicios de una señalización cruzada (*crosstalk*) intracelular entre los monómeros de este heterodímero: por un lado, la expresión y la activación del receptor D_2 por su agonista quinpirol, dan lugar a una mayor eficacia y unión del agonista alucinógeno del protómero $5-HT_{2A}$ (\pm) DOI (Albizu *et al.*, 2011); y por otro lado, los agonistas alucinógenos del receptor $5-HT_{2A}$, LSD y (\pm) DOI, producen un aumento del reconocimiento y la señalización a través del protómero D_2 por sus agonistas (Borroto-Escuela *et al.*, 2014).

- En estudios previos realizados en el grupo de investigación Biofarma se ha comprobado que la activación del receptor 5-HT_{2A} por el agonista alucinógeno (\pm) DOI modificó la señalización de la dopamina a través del receptor D₂, de manera que la dopamina tiene una menor eficacia para activar el receptor, sin variar su afinidad. Además, el (\pm) DOI también moduló el efecto de los antipsicóticos sobre el receptor D₂ produciendo unos perfiles de actuación de los antipsicóticos típicos característicos y diferentes a los perfiles de los antipsicóticos atípicos (Gómez, 2017).
- El receptor 5-HT₇ se expresa de manera endógena en la línea celular HEK293 (Johnson *et al.*, 2003). En estudios previos de nuestro grupo de investigación se comprobó que el bloqueo de este receptor por su antagonista SB269970, no modificó la potencia de los agonistas en el receptor 5-HT_{2A}, sin embargo, redujo significativamente la potencia inhibitoria de la dopamina en la acumulación de AMPc a través del receptor D₂. Asimismo, el bloqueo del receptor 5-HT₇ por SB-269970 redujo los niveles de AMPc de la vía de señalización dependiente de G_i del receptor de dopamina D₂ antagonizado por fármacos antipsicóticos (Gómez, 2017). Se probó que el receptor 5-HT₇ interfiere en los niveles de AMPc de la vía de señalización del receptor D₂. Resulta por tanto esencial, caracterizar el efecto contrario: si existe interferencia de los agonistas y antagonistas del receptor D₂ en la señalización del receptor 5-HT₇ y su implicación con el heterodímero D₂/5-HT_{2A}.

HIPÓTESIS

La heterodimerización de los receptores D_2 de dopamina y $5-HT_{2A}$ de serotonina podría inducir una señalización farmacológica intracelular diferencial a la de los receptores D_2 y $5-HT_{2A}$ monoméricos.

OBJETIVOS

Caracterizar la señalización farmacológica intracelular del heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$:

- Estudiar la implicación y/o interferencia del receptor $5-HT_7$ de serotonina en la señalización del heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$ en el modelo celular HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc- $5-HT_{2A}$ -CFP/ FLAG- D_2 -YFP.
- Caracterizar farmacológicamente la señalización cruzada de las proteínas G y los segundos mensajeros de las cascadas de señalización intracelular de los receptores D_2 de dopamina y $5-HT_{2A}$ de serotonina como monómeros o protómero del heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$.





MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES

1. Reactivos generales.

Las sales utilizadas en los distintos tampones NaCl, LiCl, KCl, KH₂PO₄, NaH₂PO₄ y Trizma[®] base fueron suministradas por Sigma Aldrich. El tampón HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*), el ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetasulfónico (HEPES), el metanol, el glicerol y el detergente Teewn 20 también fueron suministrados por Sigma Aldrich.

El dodecilsulfato sódico (SDS) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fueron suministrados por Thermo Fisher.

El azul de bromofenol, el ácido fórmico y la glicinal fueron suministrados por Panreac. La albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) fue suministrada por Roche.

2. Reactivos empleados en cultivos celulares.

El medio de cultivo empleado DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) libre de piruvato, de alta concentración de glucosa (4.5 g/L) y con L-glutamina, el suero fetal bovino dializado (FBS), la tripsina suplementada con ácido etildiaminotetracético (EDTA) y la poli-D-lisina fueron suministrados por Thermo Fisher.

La penicilina y estreptomina, el dimetilsulfóxido (DMSO) y la doxiciclina fueron suministrados por Sigma Aldrich.

La geneticina G418, la higromicina B Gold y la blastidina fueron suministrados por Invivogen.

3. Reactivos empleados en ensayos funcionales.

Para los ensayos funcionales de medición de AMPc se emplearon placas de cultivo multipocillo *half area* de 96 pocillos de Thermo Fisher. Se utilizó el kit comercial *HTRF-cAMP dynamic kit* de Cisbio.

Para los ensayos funcionales de movilización de calcio intracelular se emplearon placas de cultivo multipocillo negras de fondo transparente de

384 pocillos de Grenier. Se utilizó el kit comercial *Fura-2 QBTTM Calcium Kit* de Molecular Devices.

Para los ensayos funcionales de medición de la actividad de proteína Quinasa A se empleó el kit comercial *PKA Kinase Activity Assay Kit* de Abcam.

Para los ensayos funcionales de medición de la fosforilación de la proteína CREB se utilizaron dos kits comerciales: *AlphaLISA® SureFire® Ultra™ CREB Total Assay Kit* y *AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-CREB (Ser133) Assay Kit* de Perkin Elmer.

3.1 Reactivos farmacológicos.

- Dopamina de Sigma Aldrich.
- Serotonina de Sigma Aldrich.
- (\pm)2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina ((\pm) DOI) de Sigma Aldrich.
- SB269970 de Tocris.
- Clozapina de Sigma Aldrich.
- Haloperidol de Sigma Aldrich.
- Quinpirol de Sigma Aldrich.
- Sulpirida de Sigma Aldrich.
- Aripiprazol de Sequoia Research Products.
- Toxina Pertussis de Sigma Aldrich.
- YM-254890 de Grupo 3 S.L.
- Compuesto 48/80 de Sigma Aldrich.
- Ro32-0432 de BioGen.
- PKI 14-22 de Tocris.
- (IBMX) de Sigma Aldrich.
- Forskolina de Sigma Aldrich.

- Probenecid de Thermo Fisher.
- Ácido 1,2 Bis (2-animofenoxi) etano-N,N,N',N' tetraacético (BAPTA) de Sigma Aldrich.
- Tapsigargina de Sigma Aldrich.

4. Reactivos empleados en ensayos de radiactividad.

Para los ensayos funcionales de medición de inositol fosfato se emplearon placas de cultivo multipocillo transparentes estériles de 96 pocillos de Grenier. También se emplearon placas multipocillo *Flexiplate* de 96 pocillos de Perkin Elmer.

El radioligando [^3H]-*myo*-inositol (20,3 Ci/mmol) y las *RNA YSi Binding SPA Beads* fueron suministrados por Perkin Elmer. El etanol absoluto fue suministrado por Panreac.

5. Reactivos empleados en ensayos de biología molecular.

Para la preparación de los lisados celulares se empleó el tampón comercial de radioinmunoprecipitación *RIPA Lysis Buffer* de Santa Cruz Biotecnologies. La *Protein G-Sepharose*[®] fue suministrada por Sigma Aldrich. El inhibidor de fosfatasa *PhosSTOP*[™] fue suministrado por Roche.

El kit comercial para medir la concentración de proteína *DC*[™] *Protein Assay* fue suministrado por Bio-Rad.

Para los ensayos de western blot se empleó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein*[®] *Dual Color* y las membranas *Immuno-Bolt*[®] *PVDF* de Bio-Rad, el tampón de carga *Bolt*[®] *LDS 4X* y los geles *SDS-PAGE Bolt*[™] *4-12% Bis-Tris Plus* de Thermo Fisher. El papel Whatman utilizado para la transferencia fue suministrado por Sigma Aldrich. El reactivo de bloqueo *Immunoblot Blocking Reagent* fue suministrado por Millipore.

El revelado de las membranas se realizó con el kit comercial *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* y las películas de revelado

Amersham Hyperfilm ECL de GE Healthcare y el revelador y fijador GBX de Carestream Kodak®.

5.1 Anticuerpos.

- Anticuerpo monoclonal de ratón Anti-FLAG® M2 (ref F1804) de Sigma Aldrich.
- Anticuerpo monoclonal de conejo Anti-5HT7 (ref ab128892) de Abcam.
- Anticuerpo secundario de cabra Anti-conejo ligado a peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*, HRP) (ref 7074P2) de Werfen.
- Anticuerpo secundario de cabra Anti-ratón ligado a peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*, HRP) (ref ab205719) de Abcam.
- Anticuerpo monoclonal de conejo Anti-PKA R2/PKR2 (ref ab32514) de Abcam.
- Anticuerpo monoclonal de conejo Anti-PKA R2/PKR2 (Phospho S99) (ref ab32390) de Abcam.
- Anticuerpo monoclonal de ratón Anti- β -Actin (8H10D10) ligado a peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*, HRP) (ref 12262) de Cell Signaling.

MÉTODOS

1. Cultivo celular.

1.1 Línea celular.

En este trabajo se ha empleado la línea celular de riñón embrionario humano (*human embryonic kidney*) HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP. Esta línea celular se caracteriza porque expresa de manera constitutiva el receptor de dopamina D₂ unido por su extremo carboxilo a la proteína amarilla fluorescente (*Yellow Fluorescent Protein*, YFP) y por su extremo amino al epítipo FLAG; y de manera inducible mediante doxiciclina el receptor de serotonina 5-HT_{2A}, ligado a la proteína cian fluorescente (*Cyan Fluorescent Protein*, CFP) por su extremo carboxilo y al epítipo c-Myc por su extremo amino.

La línea celular se generó en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) por el Dr. Juan López Giménez. Para ello se utilizó la tecnología Flp-InTM que permite la integración y expresión de los genes de interés en células de mamífero en una posición del genoma específica. El sistema Flp-InTM consiste en la introducción de un sitio FRT (*Flp Recombination Target*) en el genoma de la línea celular empleada en la que, posteriormente, se integra un vector de expresión con el gen de interés a través de una recombinasa Flp que media la recombinación del ADN en el sitio FRT. La tecnología T-RexTM se basa en la introducción de un plásmido con el gen que expresa un represor de tetraciclinas (represor *tet*) que se une al operador *tet2*, que se encuentra antes de la región codificante del gen de interés, impidiendo su transcripción. La expresión del gen de interés se puede inducir mediante la adición de tetraciclinas, como la doxiciclina, que se une al represor *tet* liberándolo del operador *tet2* y permitiendo la transcripción.

1.2 Mantenimiento celular.

El mantenimiento de la línea celular se llevó a cabo empleando el medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) libre de piruvato, de alta concentración de glucosa (4.5 g/L) y con L-glutamina, suplementado con 10% de suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS) dializado sin trazas de tetraciclina para no interferir en la inducción del receptor 5-HT_{2A} y con 1% de penicilina-estreptomina. Además, se

añadieron antibióticos de selección para asegurar la correcta expresión de los genes de interés. Se añadió higromicina B 100 mg/ml, para asegurar la expresión de las células que expresan la resistencia a este antibiótico de selección y por ende la expresión del represor de tetraciclinas sin el cual no podríamos desarrollar la tecnología T-Rex™ y llevar a cabo la inducción del receptor 5-HT_{2A}. Además, se añadió geneticina G418 1 mg/ml para la selección de las células que expresan el gen de resistencia a este antibiótico y que permite seleccionar la expresión del receptor de dopamina FLAG-D₂-YFP y se completó con blasticidina 1 mg/ml para seleccionar las células que expresan el gen de resistencia a este antibiótico y, por consiguiente, el receptor c-Myc-5-HT_{2A}-CFP.

Las células se mantuvieron y cultivaron en una atmósfera de 37 °C, una presión relativa de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95% en incubadores de cultivo celular. La manipulación se llevó a cabo en cabinas de flujo laminar vertical en condiciones de esterilidad.

1.3 Descongelación celular.

Para llevar a cabo la descongelación de las células se retiró el criotubo almacenado en nitrógeno líquido y, una vez se descongeló, se resuspendieron las células en el medio de mantenimiento indicado. Para eliminar posibles restos del medio de congelación el cual está compuesto, entre otras cosas, por el agente crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) que es tóxico para las células, se centrifugaron las células durante 8 minutos a 1000 rpm. Al sedimentarse las células, se retiró el sobrenadante, se resuspendieron las células en el medio de mantenimiento y se sembraron en un frasco de cultivo (*flask*) de 25 cm² o 75 cm² dependiendo de la confluencia de las células del vial de partida.

1.4 Expansión celular.

Cuando la confluencia celular en el recipiente de cultivo fue de un 80-90% se llevó a cabo la expansión celular. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con tampón fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) compuesto por NaCl 136 mM; KH₂PO₄ 1.47 mM; NaH₂PO₄ 8 mM, KCl 2.68 mM para eliminar los restos de medio que puedan quedar. Se añadió tripsina, una enzima proteolítica que permite romper las uniones entre las células y las uniones de estas con el recipiente de cultivo, consiguiendo que las células queden en suspensión. Tras 1 o 2

minutos de incubación, se paró la reacción de la tripsina añadiendo el propio medio de cultivo y se homogeneizaron las células antes de transferirlas a un nuevo *flask* de cultivo en la dilución correspondiente dependiendo de lo requerido.

En el caso de necesitar un número concreto de células para el desarrollo de un ensayo, se hizo un recuento celular por mililitro para lo que se utilizó el contador electrónico automático VI-Cell™ XR (Beckman Coulter Life Sciences). Se diluyeron las células para obtener el número necesario en el volumen específico de cada ensayo y se sembraron en la placa multipocillo correspondiente previamente tratada con poli-D-lisina, que es un compuesto sintético que mejora la adherencia de las células a la superficie de la placa, a una dilución 1:5 en PBS durante 30 minutos.

1.5 Criopreservación celular.

La criopreservación de las células se realizó cuando la confluencia en el *flask* de cultivo de 75 cm² era de un 80-90%. Para ello se lavaron y se tripsinizaron las células como se ha explicado anteriormente y se centrifugaron durante 8 minutos a 1000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en medio de congelación que consiste en FBS dializado suplementado con 10% de DMSO que es un agente crioprotector que evita que se formen cristales en el interior de la célula cuando se produce el proceso de congelación. Las células se congelaron en criotubos de manera gradual primero a -80 °C y, finalmente, en nitrógeno líquido.

2. Ensayos funcionales de medición de AMPc intracelular.

Los ensayos funcionales de medición de AMPc que se han desarrollado en este trabajo tienen como objetivo estudiar la funcionalidad de los receptores que señalizan a través de proteínas G_s o G_{i/o}, así como la señalización intracelular de cada uno de ellos y el posible cruzamiento entre las distintas vías de señalización y en qué punto de la cascada celular se produce este *crossstalk*.

Para ello se utilizó el kit comercial *HTRF-cAMP dynamic kit* (Cisbio) el cual se basa en la tecnología HTRF® (*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*) que permite la transferencia de energía entre dos fluoróforos,

un donante y un aceptor, cuando se encuentran próximos, también denominado este efecto como transferencia de energía de resonancia (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET).

El método consiste en un inmunoensayo de competición entre el AMPc nativo que se produce en la célula y el AMPc marcado con el fluoróforo d2 (aceptor) por la unión del anticuerpo monoclonal Anti-AMPc marcado con el fluoróforo Europium Cryptate (donante). La excitación del fluoróforo donante Cryptate por una fuente de energía lleva a la emisión de energía a una longitud de onda de 620 nm, de manera que, si el fluoróforo aceptor d2 se encuentra próximo, se produce una transferencia de energía excitándose y emitiendo energía a una longitud de onda de 655 nm. Por tanto, la señal específica de FRET es inversamente proporcional a la concentración de AMPc en la célula.

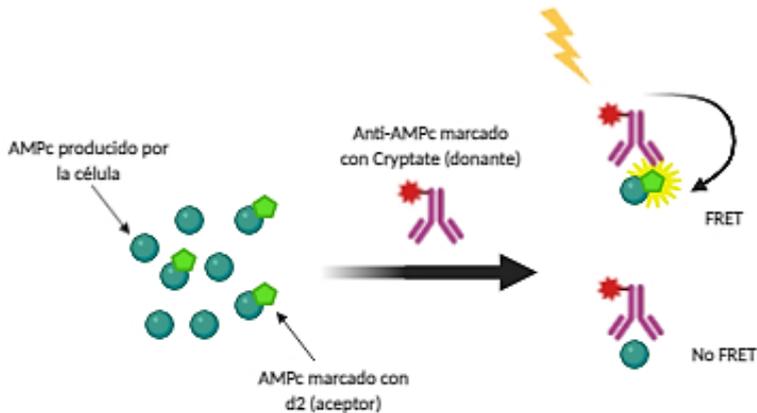


Figura 23. Fundamento de la tecnología HTRF® en inmunoensayos competitivos de AMPc. Imagen realizada por la doctoranda con BioRender.com.

2.1 Ensayos de medida de formación de AMPc modulada por los receptores D₂ y 5-HT₇.

Los ensayos funcionales se realizaron en la línea celular de estudio HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP la cual expresa de manera endógena el receptor 5-HT₇. Se sembraron 40000 células por pocillo en placas *half area* de 96 pocillos estériles de fondo blanco, previamente tratadas con poli-D-lisina, en medio de cultivo DMEM alto en glucosa y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

El tampón de ensayo, *Stimulation Buffer* suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 500 µM, se preparó mediante sonicación durante 30 minutos. Se incubaron las células 5 minutos a 37 °C, se añadieron los compuestos antagonistas y agonistas del receptor de dopamina D₂ a diferentes concentraciones y se incubaron durante 10-20 minutos a 37 °C. Tras este tiempo, se añadieron curvas del agonista del receptor 5-HT₇, la serotonina (curvas de 10⁻¹⁰ a 10⁻⁴ M); o del antagonista, SB269970 (curvas 10⁻¹¹ a 10⁻⁵ M) y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C.

Finalmente, las células se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con los reactivos del kit comercial, AMPc marcado con el fluoróforo d2 y Anti-APMc marcado con el fluoróforo Cryptate, diluidos 1:20 en el *Lysis Buffer*. Se midió el ratio de intensidad de emisión fluorescente 665/662 nm de longitud de onda en el lector de microplacas Ultra Evolution (TECAN).

En todos los ensayos, se utilizó como control basal los niveles de AMPc en ausencia de compuestos, y como control máximo los niveles de AMPc producidos por la estimulación de las células con serotonina 1 µM.

Para la confirmación del efecto de los compuestos agonistas y antagonistas del receptor D₂ de dopamina sobre la señalización del receptor de serotonina 5-HT₇ estimulado por su agonista, serotonina, o su antagonista, SB269970, se realizaron ensayos de inhibición de la proteína G_{i/o} acoplada al receptor D₂ mediante la adición de la *Toxina Pertussis* a 0,05 µg/ml y 0,1 µg/ml, tres horas antes de comenzar el ensayo.

2.2 Ensayos de medida de formación de AMPc modulada por heterodímero D₂/5-HT_{2A}.

Estos ensayos se realizaron en la línea celular de estudio HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP, en la que se llevó a cabo la inducción del receptor 5-HT_{2A} mediante la adición de doxiciclina 10 ng/ml, 24 horas antes del ensayo. En estos ensayos se sembraron 20000 células por pocillo.

Se incubaron las células 5 minutos a 37 °C con el tampón de ensayo, se añadió el antagonista del receptor 5-HT₇, SB269970, para bloquear la señalización a través de G_s y no interferir en el estudio del heterodímero D₂/5-HT_{2A} a una concentración 1 µM y el agonista alucinógeno (±) DOI 0,1 µM y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C. Tras este tiempo, se añadieron curvas del agonista del receptor D₂, la dopamina (curvas de 10⁻¹⁰ a 10⁻⁴ M); o de los antagonistas típicos y atípicos, (curvas 10⁻¹¹ a 10⁻⁵ M) y se incubaron durante 10 - 20 minutos a 37 °C. Por último, se estimuló la producción de AMPc mediante la adición de forskolina 1 µM durante 5 minutos, que activa directamente la AC y la producción de AMPc para poder ver el efecto de los agonistas y antagonistas del receptor D₂ que estimulan la proteína G_{i/o}. Finalmente, las células se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con los reactivos del kit comercial, y se midió la ratio de intensidad de emisión fluorescente 665/662 nm.

En todos los ensayos, se utilizó como control basal los niveles de AMPc en ausencia de compuestos, y como control máximo los niveles de AMPc producidos por la estimulación de las células con forskolina 1 µM.

El estudio a nivel intracelular de los distintos puntos de la cascada de señalización se realizó mediante inhibidores específicos de proteínas implicadas en estas vías. Cada tratamiento con inhibidor se puso a punto individualmente y se emplearon las condiciones que se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Condiciones de uso de los distintos inhibidores empleados en el estudio de la formación de AMPc modulada por heterodímero D₂/5-HT_{2A}.

COMPUESTO INHIBIDOR	DIANA SOBRE LA QUE ACTÚA	CONCENTRACIÓN DE USO	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Toxina Pertussis	G _i	0.1 µg/ml	16 h
YM-254890	G _q	50 nM	10 min
Compuesto 48/80	PLC	30 µM	10 min
Ro32-432	PKC	10 µM	24 h
PKI 14-22	PKA	40 µM	3 h
BAPTA	Calcio	1 mM	1 h
Tapsigargina	Ca ²⁺ ATPasa del retículo endoplasmático	10 µM	10 min

3. Ensayos funcionales de medida de acumulación de IP intracelular.

Los ensayos funcionales de medida de acumulación de IP intracelular permiten estudiar la vía de señalización del receptor 5-HT_{2A} que se acopla a la proteína G_q. La activación de esta proteína estimula la PLC que cataliza la reacción de hidrólisis de los fosfolípidos de membrana en diacilglicerol (DAG) y especies de inositol fosfato (IP) de manera que podemos cuantificar mediante radiactividad la cantidad de especies de IP formadas si previamente marcamos las células con inositol fosfato tritiado.

Los ensayos funcionales se realizaron en la línea celular de estudio HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP en la que se llevó a cabo la inducción del receptor 5-HT_{2A} mediante la adición de doxiciclina 10 ng/ml, 24 horas antes del ensayo. Se sembraron 60000 células por pocillo en placas de 96 pocillos transparentes estériles, previamente tratadas con poli-D-lisina y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Tras 24 horas, se reemplazó el medio de cultivo por medio de cultivo sin suplementar en el que se añadieron 10 µCi/ml [³H]myo-inositol y 10 ng/ml de doxiciclina para mantener la inducción del receptor.

Trascurridas 24 horas, se lavaron las células con el tampón de ensayo HBSS suplementado con HEPES 20 mM, LiCl 20 mM y BSA al 2% con un pH de 7,55 durante 10 minutos, en agitación, a 37 °C. Tras el lavado, se incubaron los compuestos agonistas y antagonistas a estudiar durante 20 minutos, en agitación a 37 °C y, a continuación, se llevó a cabo la lisis celular mediante la adición de 200 µl de ácido fórmico 100 mM durante 30 minutos a 4 °C. Se transfirieron 20 µl del lisado por pocillo a una placa *Flexiplate* en la que se añadieron 80 µl por pocillo de una dilución 1:16 de microesferas *RNA Binding YSi Spa Beads* y se homogeneizó la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. La señal radiactiva se cuantificó en un contador Microbeta² 2450 (Perkin Elmer).

En todos los ensayos, se utilizó como control basal los niveles de IP en ausencia de compuestos, y como control máximo los niveles de IP producidos por la estimulación de las células con (\pm) DOI 0,1 µM o serotonina 1 µM.

4. Ensayos funcionales de medida de movilización de calcio intracelular.

Los ensayos funcionales de movilización de calcio intracelular son otra forma de estudiar la vía de señalización del receptor 5-HT_{2A} además de estudio de la vía de inositol fosfato. De la misma manera que esta última, el receptor acoplado a proteína G_q se activa y estimula la PLC que provoca la liberación de calcio del retículo endoplasmático (Dhyani *et al.*, 2020).

Para ello se empleó el kit comercial *Fura-2 QBT™ Calcium Kit*. El Fura-2 es una sonda sensible a calcio que es absorbida por las células y se une al calcio intracelular que se libera al citoplasma variando la intensidad de fluorescencia. El fura-2 unido a calcio se excita a una longitud de onda de 340/510 nm y la sonda en ausencia de calcio lo hace a 380/510 nm, de manera que cuando se estimula el flujo de calcio aumenta la intensidad a 340/510 nm proporcionalmente a la disminución de la intensidad a 380/510nm.

Los ensayos funcionales se realizaron en la línea celular de estudio HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP en la que se llevó a

cabo la inducción del receptor 5-HT_{2A} mediante la adición de doxiciclina 10 ng/ml, 24 horas antes del ensayo. Se sembraron 10000 células por pocillo en placas de 384 pocillos negras de fondo transparente, previamente tratadas con poli-D-lisina y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

Se resuspendió la sonda Fura-2 suministrada en el kit en 10 ml de tampón de ensayo (HBSS suplementado con HEPES 20 mM y probenecid - inhibidor de transportadores de iones- 5 mM, a pH 7.4). En los casos en los que se estudió el efecto del quelante de calcio BAPTA, se añadió al tampón a una concentración final del mismo de 1 mM. Se añadieron 25 µl por pocillo de la sonda y se incubaron las células durante 1 hora a 37 °C en oscuridad.

Tras la incubación, se midieron los cambios en la intensidad de fluorescencia en un lector de placas de imagen fluorimétrica a tiempo real (FLIPR) FSDD7000EX, Hamamatsu®, que de manera automatizada dispensa los compuestos agonistas y antagonistas que estimulan el flujo de calcio. En primer lugar, se estableció una línea basal de 120 segundos, realizando medidas cada segundo. Posteriormente, se adicionaron los compuestos quedando un volumen final de 50 µl: el agonista alucinógeno (±) DOI 0,1 µM o el inhibidor de la Ca²⁺ ATPasa del retículo endoplasmático, la tapsigargina a distintas concentraciones. Se realizaron lecturas cada segundo durante 10 minutos en el caso de solo estudiar un compuesto, y 10 minutos más tras la adición del segundo compuesto en caso necesario.

En todos los ensayos, se utilizó como control basal los niveles de calcio en ausencia de compuestos, y como control máximo los niveles de calcio producidos por la estimulación de las células con (±) DOI 0,1 µM.

5. Ensayos de heterodimerización de los receptores D₂ y 5-HT₇.

Con el objetivo de estudiar la dimerización de los receptores D₂ de dopamina y 5-HT₇ de serotonina se llevaron a cabo ensayos de coimmunoprecipitación. Esta técnica permite estudiar las interacciones proteína-proteína cuando alguna de ellas es endógena y no está marcada ni sobreexpresada, como el receptor 5-HT₇ en nuestro caso. Se evaluó si este

receptor era capaz de formar dímeros con el receptor D₂ de dopamina que se sobreexpresa de manera constitutiva en la línea celular de estudio. El receptor D₂ está acoplado a una secuencia polipeptídica, el epítipo FLAG, que es una de las etiquetas proteicas más específicas y un antígeno artificial altamente afin para anticuerpos monoclonales. Así, se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación con un anticuerpo frente a este epítipo, de manera que si los receptores D₂ y 5-HT₇ formaran un heterodímero se confirmaría, posteriormente, mediante western blot con un anticuerpo frente al receptor 5-HT₇.

5.1 Preparación de muestras.

Las células HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP se mantuvieron en cultivo hasta que se alcanzó una confluencia del 80%, se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se centrifugaron a 1000 rpm durante 8 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de tampón RIPA 1X suplementado con ortovanadato sódico al 1 %, una solución de inhibidores de proteasas al 1 % y fluoruro de fenilmetilsulfonilo al 1 %. Las muestras se homogeneizaron por rotación orbital durante 1 hora a 4 °C y, posteriormente, se centrifugaron a 14000 g durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se preaclaron incubándolos con 50 µl de proteína G (*Protein G Sepharose*[®]), para eliminar otros antígenos que pudiesen estar incluidos en la muestra y que generasen uniones inespecíficas, en rotación durante 1 hora a 4 °C. Se centrifugaron las muestras a 14000g durante 1 minuto a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios. Se cuantificó la cantidad de proteína mediante el ensayo de ácido bicinonónico (BCA) y se ajustó la concentración de todas las muestras a 0,8 mg/ml.

5.2 Coimmunoprecipitación y western blot.

Se incubaron 600 µl de las muestras con 40 µl de proteína G (*Protein G Sepharose*[®]), una proteína de la pared celular bacteriana (en este caso, estreptococos) en una matriz de sefarosa que se une a inmunoglobulina (IgG) y permite que dichos anticuerpos queden retenidos, y 5 µg de anticuerpo monoclonal de ratón Anti-FLAG[®] M2 en rotación durante 1 hora a 4 °C. Las suspensiones se centrifugaron a 14000 g durante 1 minuto a 4 °C, los sobrenadantes fueron descartados y el sedimento celular se lavó 3 veces con tampón RIPA 1X.

A continuación, se resuspendieron las muestras en 40 µl de tampón Laemmli 2X (dodecilsulfato sódico (SDS) 4%, Glicerol 20%, azul de bromofenol 0,1 mg/ml y Tris-HCl 150 mM, pH 6,8) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida SDS-PAGE Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus, y se realizó la electroforesis a 165 voltios durante 30 minutos en tampón, MES (ácido etanosulfónico 2-[N-morfolino] 50 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM y SDS al 0,1%, pH 7,3).

Las muestras del gel fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno, que se activó previamente 1 minuto en metanol, mediante transferencia semiseca. Previamente la membrana, el papel whatman que se utilizó como soporte y el propio gel, se humedecieron en tampón de transferencia Towbin modificado (metanol 20 %, Tris 25 mM, glicina 192 mM a pH 8,3), durante 10 minutos. La transferencia se llevó a cabo a 15 voltios durante 90 minutos utilizando el quipo *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad).

Seguidamente, se lavaron las membranas en tampón de lavado TBS-T (Tris 20 mM, 150 mM NaCl, tween 20 al 0,1 %) 3 veces durante 5 minutos en agitación y se bloquearon con tampón TBS-T suplementado con reactivo de bloqueo al 5% durante 1 hora en agitación. Se retiró el exceso de tampón de bloqueo mediante 3 lavados de 5 minutos en agitación con el tampón de lavado. A continuación, se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en el tampón de bloqueo: 1) anticuerpo monoclonal de conejo anti-5-HT₇ diluido 1:500 y 2) anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG® M2 diluido 1:2000; y las membranas fueron incubadas durante 16 horas a 4 °C en agitación.

Al día siguiente, se lavaron las membranas con TBS-T 3 veces durante 5 minutos en agitación y se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos en tampón de bloqueo, 1) anti-conejo ligado a peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*, HRP) diluido 1:5000 y 2) anti-ratón ligado a HRP diluido 1:10000, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Después de 3 lavados de 5 minutos en agitación con TBS-T se llevó a cabo el revelado de las membranas con el kit comercial *Enhanced Chemiluminescence Prime Western Blotting Detection Reagent* y las películas fotográficas *X50 Hyperfilm® enhanced chemiluminescence* siguiendo las instrucciones del fabricante.

6. Modulación de la actividad de PKA.

Se desarrollaron ensayos de western blot para medir activación de proteínas por fosforilación y se empleó el kit comercial *PKA Kinase Activity Assay* (Abcam) para cuantificar su actividad en lisados parcialmente purificados. Por último, se utilizó otro kit comercial *AlphaLISA® SureFire® Ultra™ Assay Kit* (Perkin Elmer) para medir la cantidad de proteína CREB fosforilada que es un sustrato específico de la PKA.

6.1 Medida de la expresión de PKA por western blot.

6.1.1 Preparación de muestras.

Las células HEK 293 Flp-In™ T-Rex™ myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP se sembraron en placas de cultivo de 100 mm y se crecieron hasta que se llegó a una confluencia del 80%. Se trató con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas y durante el proceso de estimulación con los compuestos se mantuvo el medio de cultivo con IBMX 500 µM para inhibir el efecto de las fosfodiesterasas. En primer lugar, se añadió el antagonista 5-HT₇, el compuesto SB269970 1 µM y se incubó 5 minutos a 37 °C. El agonista alucinógeno (±) DOI 0,1 µM se incubó, en los casos necesarios, durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, se adicionó la dopamina 1 nM y se incubó 20 minutos a 37 °C y, por último, se estimuló la adenilato ciclasa con forskolina 10 µM durante 30 minutos a 37 °C. En los casos en los que había que preparar lisados celulares estimulando con el inhibidor de PKA, el PKI14-22, se hizo a una concentración de 40 µM 3 horas antes de empezar el ensayo.

Se lavaron las células con PBS frío, se retiró y, posteriormente, se añadió 1 ml de tampón RIPA 1X frío por placa de cultivo suplementado con ortovanadato sódico al 1 %, una solución de inhibidores de proteasas al 1 %, fluoruro de fenilmetilsulfonilo al 1 % y un comprimido por cada 10 ml de tampón de un cóctel de inhibidores de fosfatasa, Phostop®. Las células se recogieron con un rascador de plástico estéril y las suspensiones se transfirieron a tubos nuevos que se homogeneizaron por rotación durante 1 hora a 4 °C. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras a 12000g durante 30 minutos a 4 °C, los sobrenadantes se recogieron y se cuantificó la cantidad de proteína mediante el ensayo de ácido bicinónico (BCA). Todo el procesamiento de los lisados se hizo en hielo a 4 °C.

6.1.2 *Western blot de proteínas fosforiladas.*

Se incubaron distintas cantidades de muestra 20 µg de proteína durante 5 minutos a 95 °C en tampón de carga Bolt™ dodecilsulfato de litio 4X. Se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida SDS-PAGE Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus y se desarrolló la electroforesis a 165 voltios durante 30 minutos en tampón de electroforesis, MES 1 X.

Tras la activación previa de la membrana de polifluoruro de vinilideno en metanol durante 1 minuto, se humedeció en tampón de transferencia durante 10 minutos. Se desarrolló una transferencia semiseca a 15 voltios durante 90 minutos.

A continuación, se lavaron las membranas en tampón de lavado TBS-T 3 veces durante 5 minutos en agitación y se bloquearon con el tampón de bloqueo TBS-T suplementado con BSA al 3% durante 1 hora en agitación. Se lavaron las membranas y se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en el tampón de bloqueo: 1) el anticuerpo monoclonal de conejo para medir la PKA total, Anti-PKA R2/PKR2 1:10000; y 2) el anticuerpo monoclonal de conejo para medir la PKA fosforilada, Anti-PKA R2/PKR2 (*phospho S99*) 1:1000. Se empleó como control de carga el anticuerpo anti-β-actina ligado a HRP a una dilución de 1:30000.

Tras una incubación en agitación de 16 horas a 4 °C, se lavaron las membranas con TBS-T y se añadió el anticuerpo secundario anti-conejo ligado a peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*, HRP) 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se realizó el revelado de las membranas con el kit comercial *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* y las películas fotográficas *X50 Hyperfilm® enhanced chemiluminescence*.

6.2 Medida de la actividad de PKA por inmunoensayo.

Para la realización de estos ensayos se empleó el kit comercial *PKA Kinase Activity Assay* (Abcam). Se basa en la cuantificación, por un cambio colorimétrico, de la PKA capaz de fosforilar un sustrato específico que está inmovilizado en las placas multipocillo que suministra el propio kit. La PKA activa y presente en los lisados celulares fosforila el sustrato en presencia de ATP. El sustrato fosforilado es reconocido específicamente por un anticuerpo primario que, posteriormente, es reconocido por un anticuerpo

secundario ligado a HRP. El ensayo se resuelve mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina) que produce un compuesto soluble azul en presencia de la peroxidasa que puede ser leído a 665 nm. Esta reacción se detiene mediante la adición de una solución ácida, que forma un producto de reacción amarillo que permite una medición precisa de la intensidad a 450 nm. De esta manera, la cantidad de sustrato fosforilado por PKA es directamente proporcional a la intensidad de color medida a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas.

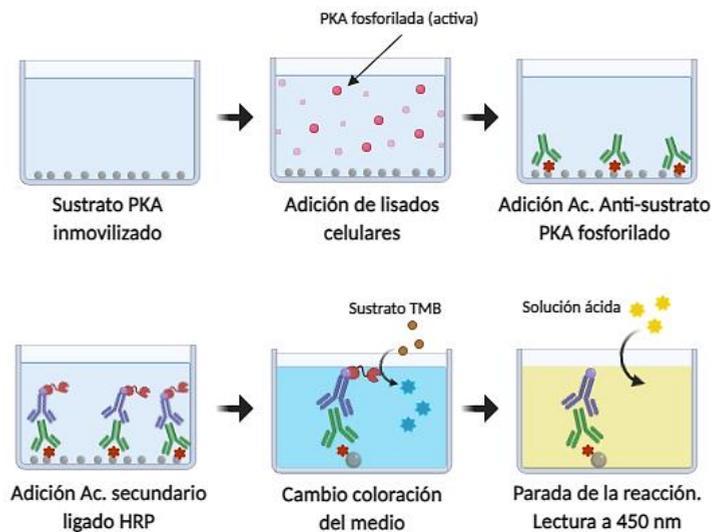


Figura 42. Esquema de la metodología empleada en el kit comercial *PKA Kinase Activity Assay* (Abcam). Imagen realizada por la doctoranda con BioRender.com.

La preparación de las muestras de lisados celulares fue igual que en el caso de los ensayos cualitativos que se llevaron a cabo para la detección de PKA por *western blot*.

Tras la preparación de los lisados celulares estimulados con distintas condiciones se optimizó la cantidad de proteína necesaria para desarrollar el ensayo de manera correcta y se seleccionó 50 ng/ml de proteína por pocillo.

El desarrollo del ensayo se desempeñó de acuerdo con lo descrito en las indicaciones del kit facilitadas por el fabricante. Brevemente, Se

prepararon las muestras y el control positivo (PKA activa purificada aportada por el fabricante) en un volumen final por pocillo de 30 μ l. Se añadieron 10 μ l de ATP para que pueda llevarse a cabo la fosforilación del sustrato específico por parte la PKA activa que hay en la muestra celular y se incubó a 30 °C durante 90 minutos con agitación intermitente cada 20 minutos. Se eliminó el medio y se añadieron 40 μ l del anticuerpo primario *PKA phosphospecific substrate antibody*, que se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación intermitente cada 20 minutos. Tras cuatro lavados con tampón de lavado se incubó con el anticuerpo secundario ligado a HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación intermitente cada 10 minutos. Se repitieron los lavados antes de añadir el sustrato de la peroxidasa, el sustrato TMB, que se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadió la solución de parada y se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 450 nm en el lector de microplacas Ultra Evolution (TECAN).

6.3 Medida de la fosforilación de CREB por tecnología Alpha[®].

Para la realización de estos ensayos se emplearon dos kits comerciales *AlphaLISA[®] SureFire[®] UltraTM Assay Kit* (Perkin Elmer), uno de ellos para medir la cantidad total de proteína CREB y otro para cuantificar la cantidad de proteína fosforilada. La proteína CREB es un sustrato específico de la PKA que la fosforila en la Serina 133 (Gonzalez and Montminy, 1989), por tanto, medimos de manera indirecta la activación de la PKA.

Los kits se basan en el empleo de microesferas y la tecnología Alpha[®] (*Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay*). La microesfera aceptora esta recubierta de un agente *CaptSureTM* que inmoviliza el anticuerpo específico para reconocer la proteína fosforilada. La microesfera donante está recubierta de estreptavidina la cual es capaz de capturar el anticuerpo biotinilado que reconoce otro epítopo de CREB.

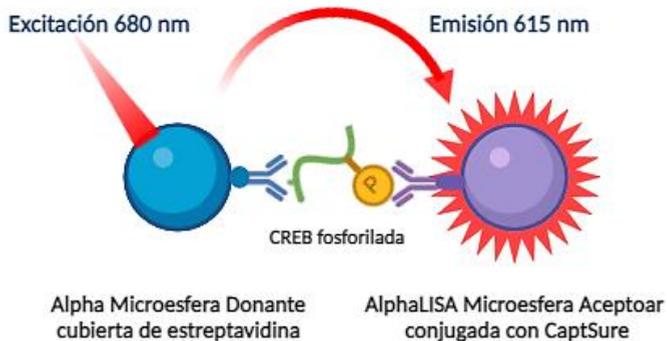


Figura 25. Esquema de la tecnología AlphaLISA® en la que se basa el kit comercial *AlphaLISA® SureFire® Ultra™ Assay Kit* (Perkin Elmer). Imagen realizada por la doctoranda con Biorender.com.

La tecnología Alpha consiste en la excitación de la microesfera aceptora por parte de la donante cuando estas se encuentran en proximidad debido a que la proteína a estudiar se encuentra fosforilada y es reconocida por ambos anticuerpos. La cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la cantidad de proteína fosforilada presente en la muestra.

El desarrollo del ensayo se desempeñó de acuerdo con lo descrito en las indicaciones del kit facilitadas por el fabricante. Brevemente, se sembraron 30000 células por pocillo en 200 μ l de medio de cultivo completo en placas transparentes estériles. Se trataron las células con doxiciclina 10 ng/ml y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se estimularon las células según las diferentes condiciones a estudiar, diluyendo los compuestos en 50 μ l de medio de cultivo libre de suero. Durante el proceso de estimulación con los compuestos se mantuvo el medio de cultivo con IBMX 500 μ M para inhibir el efecto de las fosfodiesterasas. En primer lugar, se añadió el antagonista 5-HT₇, el compuesto SB269970 1 μ M y se incubó 5 minutos a 37 °C. El agonista alucinógeno (\pm) DOI 0,1 μ M se incubó, en los casos necesarios, durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, se adicionó la dopamina 1 nM y se incubó 20 minutos a 37 °C y, por último, se estimuló la adenilato ciclasa con forskolina 10 μ M durante 30 minutos a 37 °C. En los casos en los que se estudió el efecto del inhibidor de PKA, el PKI14-22, se

hizo una incubación previa de 3 horas antes de empezar el ensayo a una concentración de 40 μM .

El lisado celular se llevó a cabo utilizando 60 μl del tampón de lisis aportado por el fabricante y agitando la placa a 350 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron 30 μl de los lisados a una placa de 96 pocillos *half area* blanca y se añadió también 30 μl del control positivo aportado en el kit. A continuación, se añadieron 15 μl de las microesferas aceptoras correspondientes a cada kit (CREB total o CREB fosforilada) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, se repitió el paso con las microesferas donantes realizando el proceso en oscuridad. En este caso la incubación fue durante toda la noche. Por último, se procedió a la lectura de la señal Alpha[®] en el lector de microplacas Enspire[®] (Perkin Elmer).

7. Análisis de datos.

Para el análisis y procesamiento de datos se utilizó el programa informático GraphPad Prism[®] versión 7.00. Todos los resultados se representaron como la media \pm error estándar de la media (*Standar Error of the Mean*, SEM).

La comparación estadística entre los parámetros de interés de las curvas sigmoidales concentración-respuesta o las medidas de intensidad de las distintas señales estudiadas se realizó mediante el uso del test *t de Student* desapareado y paramétrico. Se evaluó la diferencia significativa entre los distintos parámetros marcando la significación estadística en $\alpha=0.05$, es decir, con un intervalo de confianza del 95%. Se emplearon los siguientes parámetros farmacológicos:

- Concentración media máxima eficaz (EC_{50}), que permite compara las potencias de los distintos compuestos.
- Efecto máximo (E_{max}), que permite comparar la eficacia del compuesto.
- Efecto máximo de la forskolina 1 μM (E_{FSK}), que permite compara la eficacia del compuesto, cuando estamos estudiando la vía de

señalización a través de una proteína G_i que produce la disminución de los niveles de AMPc.

En los ensayos funcionales, tanto de medida de AMPc como de IP, se representaron curvas con la ecuación dosis-respuesta sigmoidea, que muestra la respuesta como logaritmo de la concentración:

$$E = E_{\text{basal}} + \frac{E_{\text{max}} - E_{\text{basal}}}{1 + 10^{\log EC_{50} - X}}$$

Donde E es la respuesta obtenida a una concentración X de compuesto, E_{basal} es la respuesta mínima que tienen las células en ausencia de compuesto, E_{max} es la respuesta máxima y EC_{50} (o IC_{50} en el caso del estudio de compuestos antagonistas) es la potencia del compuesto agonista. Es la concentración a la que se obtiene la mitad de la respuesta máxima.

Los datos obtenidos de los diferentes ensayos se estandarizaron siempre en base a una respuesta máxima y una mínima de la siguiente manera:

- En los ensayos de medición de AMPc los datos se normalizaron a la respuesta mínima o basal que es en ausencia de estímulo y representa el 0%, y a la respuesta máxima o 100% que se consideró la estimulación con forskolina 1 μM o serotonina 1 μM dependiendo del ensayo.
- En los ensayos de medición de IPs, los datos también se normalizaron a la respuesta máxima que se consideró el 100% cuando se estimuló con serotonina 1 μM o DOI 0,1 μM , y a la respuesta mínima sin estímulo o basal que se consideró el 0%.
- En todos los ensayos de calcio se normalizaron los datos con respecto al nivel basal o 0% y respecto a la señal máxima correspondiente a la estimulación con (\pm) DOI 0,1 μM . Se representó el ratio entre las medidas obtenidas a una intensidad de 340 nm y las medidas obtenidas a 380 nm correspondiente a unidades de fluorescencia relativas (RFU).

- En los ensayos de medida de la PKA los datos se normalizaron con respecto a la respuesta mínima o blanco del ensayo que se consideró el 0%, y a la respuesta máxima que se consideró el 100% y se corresponde con la señal de la PKA purificada activa que suministra el fabricante del kit.
- En los ensayos de western blot de proteínas fosforiladas se densitometraron las muestras reveladas utilizando el programa informático ImageJ[®]. Los resultados obtenidos de proteína total y proteína fosforilada se representaron utilizando la siguiente fórmula:

$$\textit{Intensidad de PKA relativa} = \frac{\textit{PKA fosforilada (fPKA)}}{\textit{PKA total (tPKA)}}$$

- En los ensayos de medida de la fosforilación de CREB los datos se normalizaron con respecto a la respuesta mínima (condiciones en las que no se utilizaba muestra celular) que se consideró el 0%, y a la respuesta máxima correspondiente con el control positivo de CREB fosforilada suministrada por el fabricante del kit y que se consideró el 100%.





RESULTADOS



RESULTADOS

1. Estudio de la señalización cruzada entre los receptores D₂ y 5-HT₇ y su farmacología.

Con el objetivo de estudiar la señalización cruzada entre el receptor de dopamina D₂ y el receptor de serotonina 5-HT₇, se realizaron dos tipos de ensayos:

- 1) Ensayos funcionales de medida de la acumulación de AMPc como mensajero intracelular asociado a la estimulación de las proteínas G.
- 2) Técnicas de biología molecular para estudiar una posible interacción física entre ambos receptores como complejos diméricos en la membrana celular.

1.1 Estudio de la señalización cruzada entre los receptores D₂ y 5-HT₇.

Para estudiar la señalización cruzada de ambos receptores a nivel intracelular se emplearon ensayos funcionales de acumulación de AMPc que se realizaron mediante el kit comercial *HTRF-cAMP dynamic kit* de Cisbio.

La vía de señalización del receptor de dopamina D₂ se da través de la proteína G_{i/o} que implica una disminución de la producción total de AMPc por inhibición directa de la adenilato ciclasa (AC). Sin embargo, la señalización del receptor de serotonina 5-HT₇ se produce a través de la proteína G_s que activa la AC y produce un aumento de los niveles totales de este mensajero en el interior de la célula. En estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio se comprobó que la actividad de agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₇ modulaban la señalización a través del receptor D₂, modificando los niveles de AMPc (Gómez, 2017). En este trabajo se estudió el efecto de los agonistas y antagonistas del receptor D₂ sobre la señalización del receptor 5-HT₇.

1.1.1 *Los agonistas del receptor D₂ modulan la vía de señalización de la serotonina a través del receptor 5-HT₇.*

Para evaluar el efecto de los agonistas del receptor D₂ sobre la respuesta del receptor 5-HT₇ estimulado por su agonista endógeno la serotonina, se construyeron curvas concentración-respuesta de este y se incubaron con los agonistas totales, dopamina y quinpirol, a una concentración de 1 μM, y el agonista parcial, aripiprazol, a una concentración de 0.1 μM (**Figura 24**).

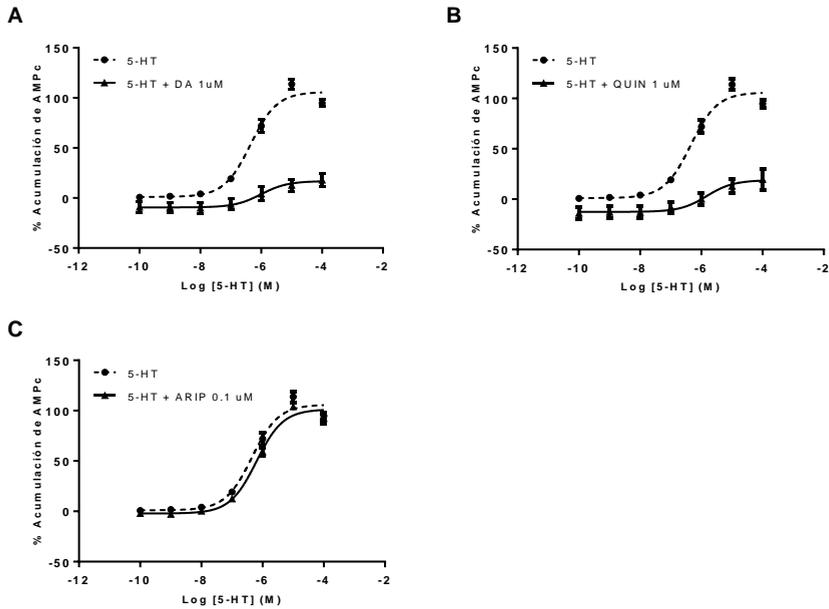


Figura 24. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por serotonina en ausencia (-●-) y en presencia (▲) de agonistas del receptor D₂: dopamina 1 μM (A), quinpirol 1 μM (B) y aripiprazol 0.1 μM (C). Se representa la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

El efecto de la serotonina fue inhibido en presencia de los agonistas completos, disminuyendo la respuesta máxima de acumulación de AMPc de manera estadísticamente significativa (*p* valor de la dopamina = 0.0006 y *p* valor del quinpirol = 0.0082). Los valores de respuesta máxima

disminuyeron un 88.3% en el caso de la dopamina, y un 86.3% en el caso del quinpirol. El aripiprazol no modificó la potencia ni la eficacia de la serotonina (**Tabla 3**).

Tabla 3. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de la serotonina (5-HT) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia de agonistas del receptor D_2 : dopamina (DA) $1 \mu M$, quinpirol (QUIN) $1 \mu M$ y aripiprazol (ARIP) $0.1 \mu M$. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados. ** p valor <0.01 ; *** p valor <0.001 (test t de Student).

AGONISTA D_2	AGONISTA 5-HT $_7$	EC_{50} (μM)	E_{MAX} (%)
-	5-HT	0.46 ± 1.4	106 ± 5.9
DA $1 \mu M$	5-HT	1.86 ± 1.6	$17.7 \pm 2.2^{***}$
QUIN $1 \mu M$	5-HT	1.95 ± 1.4	$19.7 \pm 1.7^{**}$
ARIP $0.1 \mu M$	5-HT	0.64 ± 1.2	102 ± 3.5

1.1.2 Los antagonistas del receptor D_2 no influyen en la vía de señalización de la serotonina a través del receptor 5-HT $_7$.

El efecto de los antagonistas del receptor D_2 sobre la respuesta del receptor 5-HT $_7$ estimulado por su agonista endógeno la serotonina, se evaluó mediante la construcción de curvas concentración-respuesta de este en presencia de los antagonistas D_2 , sulpirida y haloperidol, a una concentración $0.1 \mu M$ (**Figura 25**).

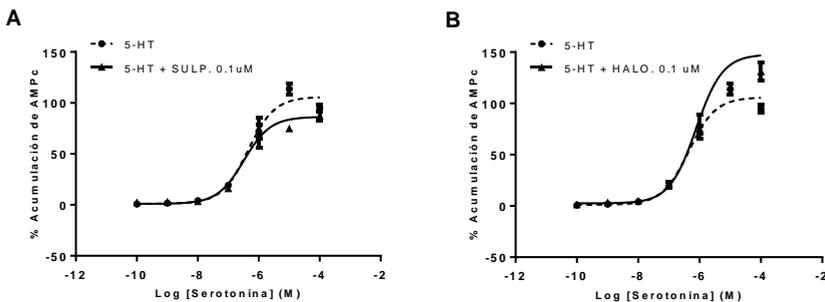


Figura 25. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por

serotonina en ausencia (-●-) y en presencia (-▲-) de antagonistas del receptor D₂: sulpirida 0.1 μM (A) y haloperidol 0.1 μM (B). Se representa la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

La respuesta máxima de la serotonina no se modificó de manera significativa en presencia de los antagonistas (**Tabla 4**).

Tabla 4. Potencia y eficacia (EC₅₀ y E_{max}) de la serotonina (5-HT) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia de antagonistas del receptor D₂: sulpirida (SULP) 0,1 μM y haloperidol (HALO) 0.1 μM. Se representa la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

ANTAGONISTA D ₂	AGONISTA 5-HT ₇	EC ₅₀ (μM)	E _{MAX} (%)
-	5-HT	0.46 ± 1.4	106 ± 5.9
SULP 0.1 μM	5-HT	0.39 ± 1.6	143 ± 10
HALO 0.1 μM	5-HT	0.80 ± 1.3	145 ± 5.9

1.1.3 Los agonistas del receptor D₂ modulan la vía de señalización del receptor 5-HT₇ bloqueado por su antagonista específico SB269970.

Para comprobar que el efecto de los agonistas de D₂ sobre la serotonina está mediado por el receptor 5-HT₇ se estudió cómo afectan estos compuestos sobre este receptor bloqueado por su antagonista específico SB269970. Para ello, se construyeron curvas concentración-respuesta del antagonista en presencia de serotonina 1 μM en ausencia o presencia de dopamina o quinpirol 1 μM o aripiprazol 0.1 μM (**Figura 26**).

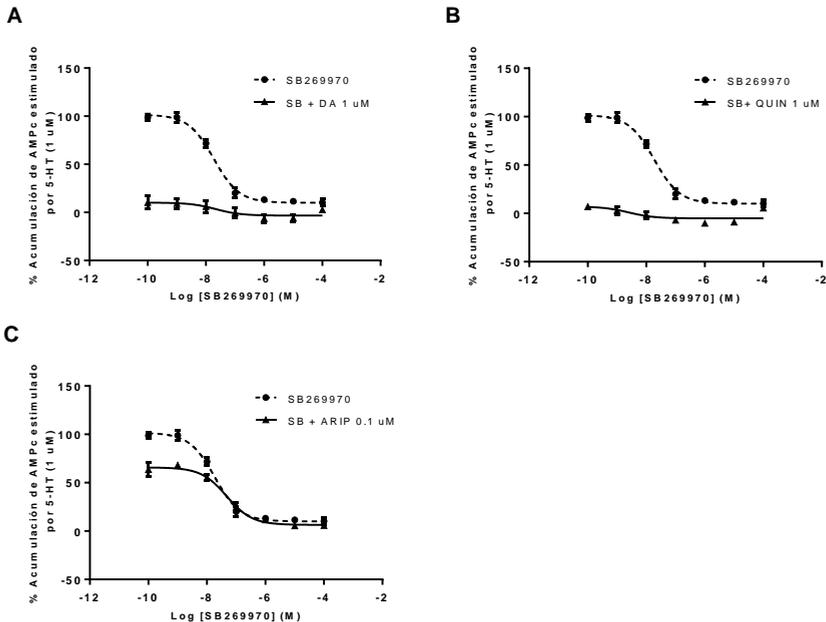


Figura 26. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc del antagonista SB269970 estimulado por 5-HT 1 μM en ausencia (-●-) y en presencia (-▲-) de agonistas del receptor D₂: dopamina 1 μM (A), quinpirol 1 μM (B) y aripiprazol 0.1 μM (C). Se representa la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

Los agonistas D₂ disminuyeron de manera estadísticamente significativa el efecto de la serotonina a través del receptor 5-HT₇ antagonizado por SB269970. La disminución de la respuesta máxima de serotonina antagonizada por SB269970 fue de 93.6% (DA 1 μM, p valor = 0.0012), 88.8 % (QUIN 1 μM, p valor = 0.0001) y 33.4% (ARIP 0.1 μM, p valor = 0.0036).

En el caso del aripiprazol, el agonista de D₂ modificó la IC₅₀ del SB269970 sobre la respuesta de la serotonina de manera estadísticamente significativa (p valor = 0.0494) (Tabla 5).

Tabla 5. Respuesta inhibitoria del antagonista SB269970 (IC_{50} y porcentaje de inhibición sobre la respuesta máxima de 5-HT) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia de agonistas del receptor D_2 : dopamina (DA) $1 \mu M$, quinpirol (QUIN) $1 \mu M$ y aripirazol (ARIP) $0.1 \mu M$. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados. * p valor <0.05 ; ** p valor <0.01 ; *** p valor <0.001 (test t de Student).

AGONISTA D_2	ANTAGONISTA 5-HT $_7$	IC_{50} (nM)	REDUCCIÓN RESPUESTA MÁXIMA A AGONISTA (%)
-	SB269970	$20,9 \pm 1,4$	-
DA $1 \mu M$	SB269970	$31,8 \pm 4,7$	$93.6 \pm 1.9^{**}$
QUIN $1 \mu M$	SB269970	$6,99 \pm 30$	$88.8 \pm 4.5^{***}$
ARIP $0.1 \mu M$	SB269970	$66,3 \pm 1,9^*$	$33.4 \pm 4.1^{**}$

1.1.4 Los antagonistas del receptor D_2 no modulan la vía de señalización del receptor 5-HT $_7$ bloqueado por su antagonista específico SB269970.

Se evaluó el efecto de los antagonistas de D_2 sobre la serotonina mediado por el receptor 5-HT $_7$ cuando este receptor está bloqueado por su antagonista específico SB269970. Para ello, se construyeron curvas concentración-respuesta del antagonista en presencia de serotonina $1 \mu M$ en ausencia o presencia de sulpirida o haloperidol $0.1 \mu M$ (Figura 27).

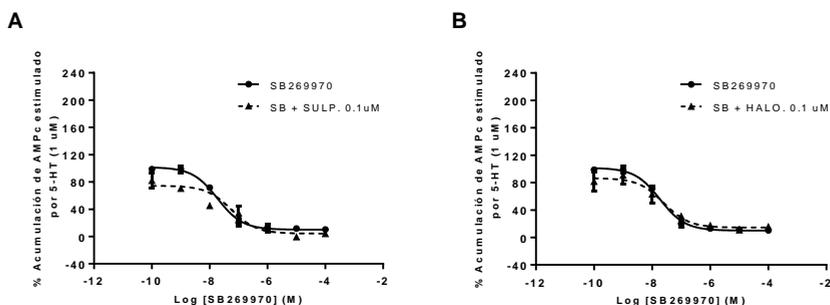


Figura 27. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc del antagonista SB269970 estimulado por 5-HT $1 \mu M$ en ausencia (-●-) y en presencia (-▲-) de antagonistas del receptor D_2 : sulpirida $0,1 \mu M$ (A) y haloperidol $0,1 \mu M$ (B). Se

representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

Se observó que los antagonistas de D_2 no modificaron el efecto de la serotonina a través del receptor $5-HT_7$ antagonizado por SB269970 (**Tabla 6**).

Tabla 6. Respuesta inhibitoria del antagonista SB269970 (IC_{50} y porcentaje de inhibición sobre la respuesta máxima de 5-HT) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia de antagonistas del receptor D_2 : sulpirida (SULP) 0,1 μ M y haloperidol (HALO) 0,1 μ M. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

ANTAGONISTA D_2	ANTAGONISTA $5-HT_7$	IC_{50} (nM)	REDUCCIÓN RESPUESTA MÁXIMA A AGONISTA (%)
-	SB269970	20.9 \pm 1.4	-
SULP 0,1 μ M	SB269970	56.6 \pm 1.7	26.6 \pm 6.2
HALO 0.1 μ M	SB269970	23.4 \pm 1.7	14.2 \pm 4.0

1.1.5 *El efecto de la dopamina y el haloperidol en la señalización serotoninérgica del receptor $5-HT_7$ es mediado a través de la proteína G_i/o .*

Con el fin de determinar si el efecto que se muestra de los agonistas y antagonistas de D_2 es mediado por la proteína G_i acoplada a este receptor, se utilizó la *toxina pertussis*, que inhibe la proteína G_i impidiendo su unión al receptor (Tamura *et al.*, 1982).

Se construyeron curvas concentración-respuesta de 5-HT o SB269970 en presencia de 5-HT 1 μ M y se incubaron con el agonista D_2 de referencia, dopamina 1 μ M (**Figura 28** y **Tabla 7**) o en antagonista referente, haloperidol 0.1 μ M (**Figura 29** y **Tabla 8**). Se trataron las células con *toxina pertussis* 0.05 μ g/ml o 0.1 μ g/ml. Se observó que el tratamiento con la toxina revierte el efecto inhibitorio de la dopamina sobre la respuesta máxima de la serotonina a través del receptor $5-HT_7$ ya que también se

observó en presencia del antagonista específico del receptor, el compuesto SB269970.

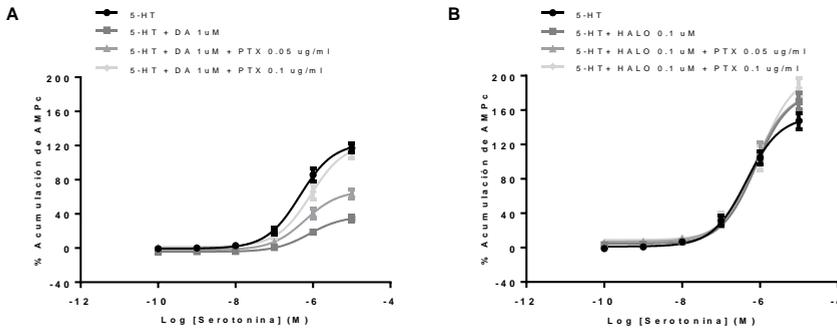


Figura 28. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por 5-HT (●), en presencia del agonista dopamina 1 μ M (A) o del antagonista haloperidol 0.1 μ M (B) de D₂ (■), en presencia del agonista o antagonista y PTX 0.05 μ g/ml (▲) y en presencia del agonista o antagonista y PTX 0.1 μ g/ml (◐). Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

Tabla 7. Potencia y eficacia (EC₅₀ y E_{max}) de la serotonina (5-HT) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia de dopamina 1 μ M o haloperidol 0.1 μ M y PTX 0.05 μ g/ml o 0.1 μ g/ml. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

COMPUESTOS	DOPAMINA		HALOPERIDOL	
	EC ₅₀ (nM)	E _{MAX} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{MAX} (%)
5-HT	460 \pm 1.2	123 \pm 4.8	443 \pm 1.2	153 \pm 6.2
Ago/Antago D ₂	804 \pm 1.3	37.5 \pm 2.5	757 \pm 1.2	182 \pm 6.2
PTX 0.05 μ g/ml	627 \pm 1.3	67.5 \pm 4.1	685 \pm 1.2	182 \pm 8.6
PTX 0.1 μ g/ml	873 \pm 1.3	123 \pm 7.2	959 \pm 1.3	202 \pm 11

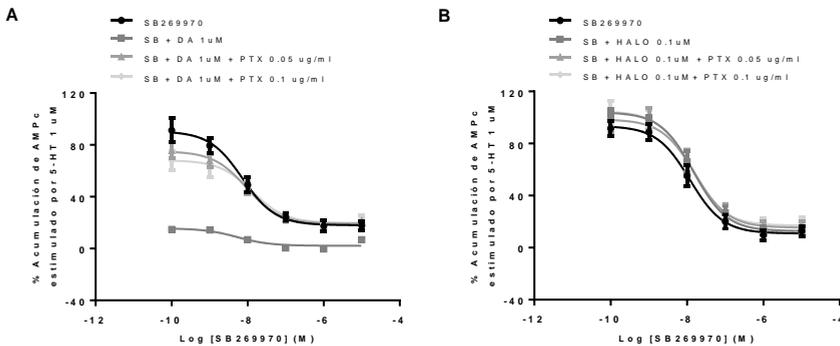


Figura 29. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc del antagonista SB269970 estimulado por 5-HT 1 μM (●), en presencia del agonista dopamina 1 μM (A) o del antagonista haloperidol 0.1 μM (B) de D_2 (■), en presencia del agonista o antagonista y PTX 0.05 $\mu\text{g/ml}$ (▲) y en presencia del agonista o antagonista y PTX 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (◆). Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

Tabla 8. Respuesta inhibitoria del antagonista SB269970 (IC_{50} y porcentaje de inhibición sobre la respuesta máxima de 5-HT) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia de dopamina 1 μM o haloperidol 0.1 μM y PTX 0.05 $\mu\text{g/ml}$ o 0.1 $\mu\text{g/ml}$. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

COMPUESTOS	DOPAMINA		HALOPERIDOL
	IC_{50} (nM)	REDUCCIÓN RESPUESTA MÁXIMA AGONISTA (%)	IC_{50} (nM)
SB	7.27 \pm 1.5	-	11.8 \pm 1.4
Ago/Antago D_2	5.30 \pm 1.9	75 \pm 1.6	14.8 \pm 1.3
PTX 0.05 $\mu\text{g/ml}$	9.22 \pm 1.4	15.5 \pm 3.5	16.0 \pm 1.5
PTX 0.1 $\mu\text{g/ml}$	13.4 \pm 1.7	22.4 \pm 4.5	12.9 \pm 1.5

1.2 La señalización cruzada entre los receptores D₂ y 5-HT₇ no se atribuye a una oligomerización de estos receptores.

Una vez estudiado el cruzamiento en la señalización intracelular a nivel del segundo mensajero AMPc de ambos receptores, se caracterizó la expresión de estos receptores en la línea celular de estudio.

Primero se evaluó la expresión endógena del receptor 5-HT₇ por las células HEK293 mediante técnicas de western blot. Posteriormente, con el fin de estudiar la formación de complejos heteroméricos entre estos receptores, se desarrollaron ensayos de coimmunoprecipitación y técnicas de western blot.

1.2.1 Estudio de la expresión del receptor 5-HT₇ endógeno en la línea celular de trabajo.

Para comprobar la expresión del receptor endógeno 5-HT₇ se optimizaron ensayos de western blot para confirmar la expresión del receptor.

Se observó una banda de 55 KDa de mayor intensidad a medida que se aumentó la cantidad de proteína, que se corresponde con el peso molecular del receptor 5-HT₇ según la bibliografía (54 KDa)(*Recombinant Anti-5HT₇ Receptor antibody [EPR6271] (ab128892) | Abcam*) (**Figura 30**).

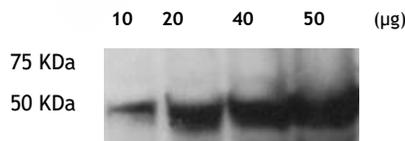


Figura 30. Western blot del lisado de células de la línea celular de trabajo. Se usaron cantidades crecientes de proteína (10, 20, 40 y 50 µg de lisado). Se marcó con el anticuerpo anti-5HT₇ 1/500 y se reveló con el anticuerpo anti-conejo-HRP 1/5000. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.

1.2.2 Estudio de la expresión del receptor D_2 sobreexpresado en la línea celular de trabajo.

Se evaluó la expresión del receptor D_2 , que en la línea celular de estudio se expresa unido al epítipo FLAG, un polipéptido de ocho aminoácidos que se utiliza como marcador de proteínas y que ayuda a su detección y análisis (Einhauer and Jungbauer, 2001).

Se realizaron ensayos de western blot con distinta cantidad de proteína de la línea celular de estudio. Se Observó una banda creciente a medida que la cantidad de proteína era mayor con un peso molecular aproximado de 70 KDa correspondiente al receptor unido al epítipo FLAG (**Figura 31**).

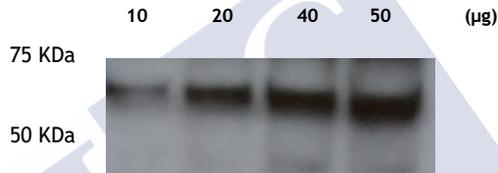


Figura 31. Western blot del lisado de células de la línea celular de trabajo. Se usaron cantidades decrecientes de proteína (10, 20, 40 y 50 µg de lisado). Se marcó con el anticuerpo anti-FLAG 1/2000 y se reveló con el anticuerpo anti-ratón-HRP 1/10000. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

1.2.3 El cruce de la señalización de los receptores D_2 y $5-HT_7$ no implica una estructura cuaternaria heterodimérica.

Una vez comprobada por western blot la expresión de ambos receptores y optimizada la concentración de anticuerpo necesaria para reconocerlos, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación con el fin de estudiar la formación de complejos entre ambos receptores.

Para ello se usó el anticuerpo anti-FLAG que reconoce el epítipo FLAG unido al receptor D_2 y se precipitó usando una matriz de proteína G en la que quedan retenidos los anticuerpos. A continuación, las muestras precipitadas se incubaron con el anticuerpo anti- $5HT_7$ y se revelaron por western blot.

No se observaron bandas inmunorreactivas frente al receptor 5-HT₇ en las muestras inmunoprecipitadas (IP). Estas bandas se observaron en las muestras control de los lisados celulares previos a la inmunoprecipitación (L) y en el sobrenadante que se descarta en el proceso de la inmunoprecipitación (S) (**Figura 32**) tanto en la línea de trabajo como en la línea control *wild type* (WT).

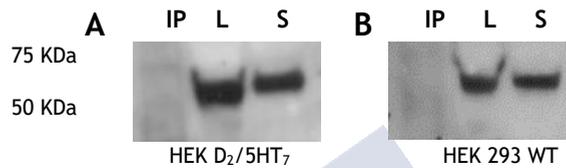


Figura 32. Western blot del lisado de células de la línea celular de trabajo (A) y de la línea HEK 293 *wild type* (B). Se muestra el resultado de la coimmunoprecipitación (IP), el lisado sin coimmunoprecipitar (L) y el sobrenadante de la coimmunoprecipitación (S). La coimmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo anti-FLAG 1/2000. Se marcó con anti-5-HT₇ 1/500 y se reveló con el anticuerpo anti-conejo-HRP 1/5000. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

Como control del proceso de inmunoprecipitación, se revelaron las muestras con el anticuerpo anti-FLAG que se usa en la precipitación. Se observó una banda correspondiente al receptor D₂ en las muestras inmunoprecipitadas (IP) reveladas con el anti-FLAG (**Figura 33**).

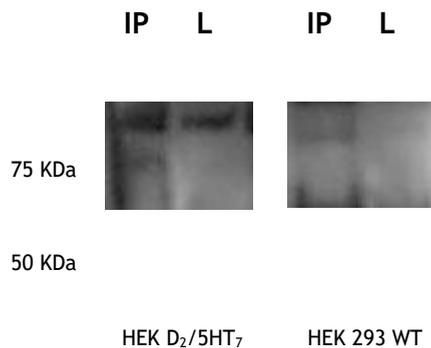


Figura 33. Western blot del lisado de células de la línea celular de trabajo. Se muestra el resultado de la coimmunoprecipitación (IP) y el lisado sin coimmunoprecipitar (L). La coimmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo anti-FLAG 1/2000. Se marcó con el anticuerpo anti-FLAG 1/2000 y se reveló con el anticuerpo anti-ratón-HRP 1/10000. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.

La confirmación de la ausencia de formación de un dímero entre el receptor D_2 y $5-HT_7$ permitió estudiar el heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$ y su señalización cruzada intracelular sin la interferencia del receptor $5-HT_7$.

2. Estudio de la señalización intracelular cruzada del heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$ y su farmacología.

Los receptores D_2 y $5-HT_{2A}$ forman complejos heterodiméricos en la membrana celular como se ha descrito en modelos *in vitro* (Borroto-Escuela *et al.*, 2010; Lukaszewicz *et al.*, 2010) y en cerebro humano (Borroto-Escuela *et al.*, 2013). Además, en trabajos anteriores realizados en nuestro grupo de investigación se observó una modulación funcional mediada por agonistas del receptor $5-HT_{2A}$ sobre la señalización del receptor D_2 (Gómez, 2017).

Con el fin de estudiar el cruzamiento en la señal de estos dos receptores, se llevaron a cabo ensayos funcionales mediante la medición de distintos segundos mensajeros como AMPc, IPs o Ca^{2+} . Se utilizaron inhibidores a diferentes niveles de las cascadas intracelulares para evaluar la implicación de cada molécula en la modulación de la respuesta funcional.

2.1 Estudio de la activación del receptor $5-HT_{2A}$ y su efecto sobre la respuesta de la dopamina en el receptor D_2 .

En una primera aproximación, se evaluó la capacidad de los agonistas del receptor $5-HT_{2A}$ de movilizar AMPc a través de la estimulación de este mismo. El receptor está acoplado a la proteína G_q que moviliza la formación de IPs y Ca^{2+} de manera canónica (Masson *et al.*, 2012).

Además, se estudió el efecto de la forskolina sobre la estimulación de la adenilato ciclasa, ya que en los ensayos de medición de la acumulación

de AMPc del receptor D_2 es necesario la estimulación de la AC por este compuesto debido a que el receptor está acoplado a una proteína G_i y medimos la capacidad que tiene de disminuir la producción de AMPc.

Se evaluó, por tanto, cómo afecta la formación del heterodímero a la señalización de la dopamina sobre el receptor D_2 en presencia de los de agonistas 5-HT_{2A} estimulando o no la AC con la forskolina.

Para ello se utilizó la línea celular HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP que expresa el receptor D_2 de manera constitutiva y el receptor 5-HT_{2A} de manera inducible. Por otro lado, se utilizó una línea HEK293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A} que expresa exclusivamente el receptor 5-HT_{2A}. En todos los ensayos realizados se utilizó el antagonista del receptor 5-HT₇ SB269970 para bloquear la señal de este y que no interfiriese en los resultados obtenidos.

2.1.1 La serotonina estimuló la producción de AMPc en presencia de forskolina en la línea celular que coexpresa los receptores D_2 y 5-HT_{2A}.

Se evaluó el efecto de la serotonina, agonista endógeno del receptor 5-HT_{2A} y su capacidad de movilizar AMPc a través de este receptor cuando se expresa de manera individual o como heterodímero con el receptor D_2 . También se comprobó el efecto que tiene la estimulación de la AC con forskolina sobre el efecto de este agonista en la acumulación de AMPc. Para ello se construyeron curvas concentración-respuesta de serotonina en ausencia o presencia de forskolina 1 μ M en las diferentes líneas celulares.

Se observó que en ausencia de forskolina la serotonina no movilizó AMPc en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Sin embargo, la activación de AC mediada por FSK indujo un aumento concentración dependiente de AMPc cuando se expresan el heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$, pero no se observó este efecto cuando los receptores se expresan de forma independiente (**Figura 34**).

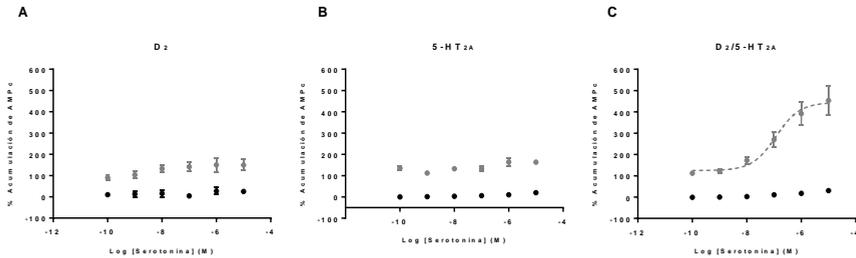


Figura 34. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc del agonista 5-HT en ausencia (-●-) y en presencia (-○-) de forskolina 1 μ M, en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (C), y en células que solo expresan el receptor 5-HT_{2A} (B). Se representa la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes realizados por triplicados.

Para confirmar que el efecto de movilización de AMPc por parte de la serotonina se producía a través del receptor 5-HT_{2A} y no del receptor endógeno 5-HT₇ que se expresa de manera endógena en la línea celular HEK293 y que está acoplado a proteína G_s, se utilizó el antagonista específico de 5-HT_{2A} ketanserina a una concentración 1 μ M (**Figura 35**).

Se observó que, en presencia de ketanserina 1 μ M, se revirtió el efecto de movilización de AMPc de la serotonina a una concentración de 0.1 μ M, disminuyendo la respuesta máxima respecto al efecto potenciador de la forskolina de 235% \pm 13.3 a 135% \pm 9.3 (**Tabla 9**).

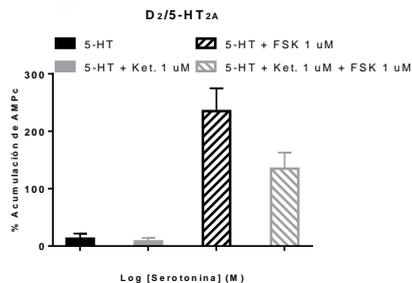


Figura 35. Representación de la acumulación de AMPc del agonista 5-HT (0.1 μ M), en ausencia (negro) y en presencia (negro rayado) de forskolina 1 μ M; y en presencia del antagonista 5-HT_{2A}, ketanserina 1 μ M, en ausencia (gris) y en presencia forskolina

1 μM (gris rayado) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

Tabla 9. Respuesta máxima de la serotonina (5-HT 0.1 μM) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia de forskolina (FSK) 1 μM y del antagonista 5-HT_{2A} ketanserina (KET) 1 μM en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

AGONISTA 5-HT _{2A}	ACTIVADOR AC	ANTAGONISTA 5-HT _{2A}	E _{MAX} (%)
5-HT	+ FSK 1 μM	-	235 \pm 13.3
		KET 1 μM	135 \pm 9.3
	- FSK 1 μM	-	12.8 \pm 3.0
		KET 1 μM	8.10 \pm 2.0

2.1.2 El agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (\pm) DOI, estimuló la producción de AMPc en presencia de forskolina en la línea celular que coexpresa los receptores D₂ y 5-HT_{2A}.

Para descartar una posible interacción de la serotonina en el receptor 5-HT₇ sobre la modulación de AMPc se llevaron a cabo ensayos con el agonista específico del receptor 5-HT_{2A}, (\pm) DOI (**Figura 36**).

Al igual que sucedía con la serotonina, se observó que el (\pm) DOI moviliza AMPc en presencia de forskolina cuando se expresa el heterodímero D₂/5-HT_{2A}, mientras que no lo moviliza cuando ambos receptores se estudian individualmente.

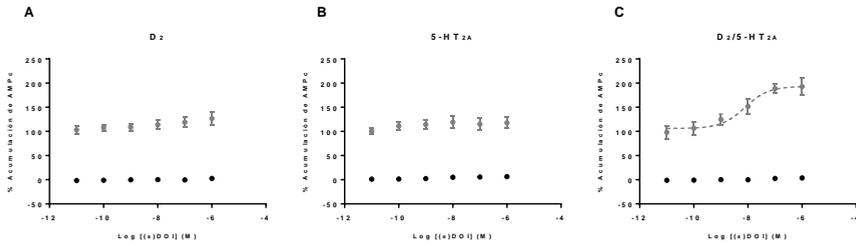


Figura 36. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI en ausencia (-●-) y en presencia (-○-) de forskolina 1 μM, en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (C), y en células que solo expresan el receptor 5-HT_{2A} (B). Se representa la media ± EEM de cuatro experimentos independientes realizados por triplicados.

2.1.3 La producción de especies de inositol fosfato estimulada por los agonistas 5-HT_{2A}, (±) DOI y serotonina, es independiente de forskolina.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la forskolina al estimular la AC sobre la cascada de señalización de la proteína G_q, se llevaron a cabo ensayos de medida de acumulación de IPs con ambos agonistas del receptor 5-HT_{2A}. Se construyeron curvas concentración-respuesta de los agonistas serotonina y (±) DOI en presencia de forskolina 1 μM (**Figura 37**).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta de los agonistas en presencia o ausencia de forskolina en la acumulación de IPs (**Tabla 10**).

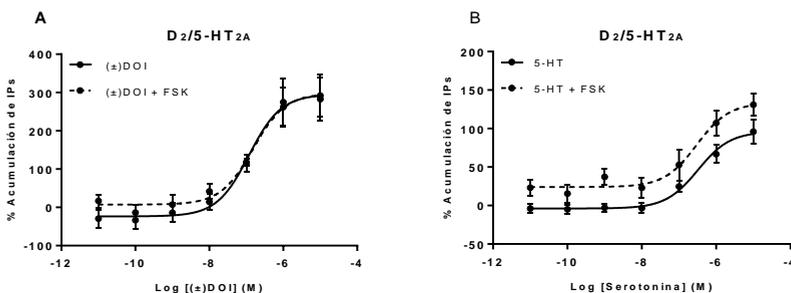


Figura 37. Curvas concentración-respuesta de acumulación de IPs del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI (A) o el agonista 5-HT (B) en ausencia (—●—) y en presencia (-●-) de forskolina 1 μM, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

Tabla 10. Potencia y eficacia (EC₅₀ y E_{max}) de la serotonina (5-HT) o el (±) DOI en la acumulación de IPs en ausencia o presencia de forskolina (FSK) 1 μM en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

AGONISTA 5-HT _{2A}	ACTIVADOR AC	EC ₅₀ (nM)	E _{MAX} (%)
5-HT	FSK 1 μM	361 ± 2.2	141 ± 16
	-	411 ± 1.4	101 ± 7.2
(±) DOI	FSK 1 μM	150 ± 1.8	308 ± 27
	-	76.4 ± 1.9	239 ± 21

Además, se comprobó si la estimulación de la AC inducida por forskolina podía tener un efecto dependiente del tiempo en la acumulación de especies de IPs. Para ello se realizaron ensayos incubando forskolina 1 μM a diferentes tiempos en presencia de serotonina 1 μM o (±) DOI 0.1 μM (**Figura 38**).

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los tiempos estudiados indicando que la estimulación de la AC con forskolina es independiente temporalmente de la acumulación de especies de IPs de manera significativa.

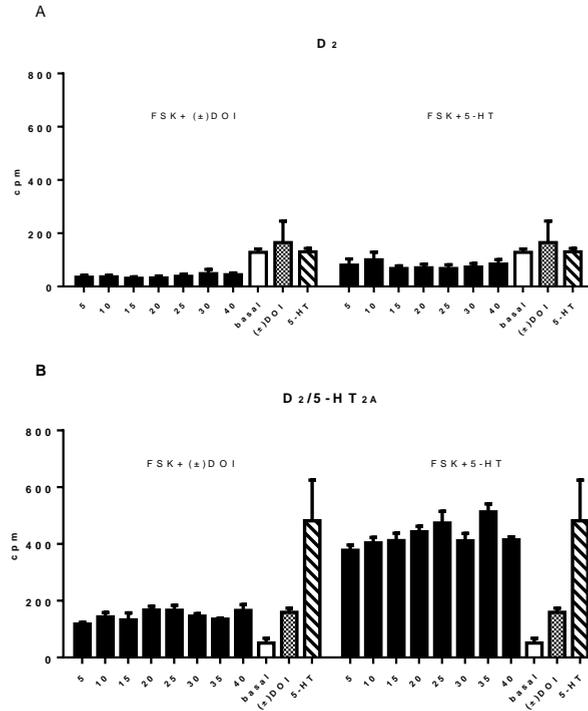


Figura 38. Representación de la acumulación de IPs en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (B) estimuladas con forskolina 1 μ M a diferentes tiempos, y adicionalmente con el agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (\pm) DOI o el agonista 5-HT. Se representa la media \pm EEM de un experimento representativo realizado por cuadruplicados.

2.2 Estudio de la implicación de diferentes proteínas de la cascada intracelular de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en la señalización cruzada del heterodímero.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se observó una modulación del efecto de la dopamina en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (\pm) DOI, en células que expresaban ambos receptores (Figura 39).

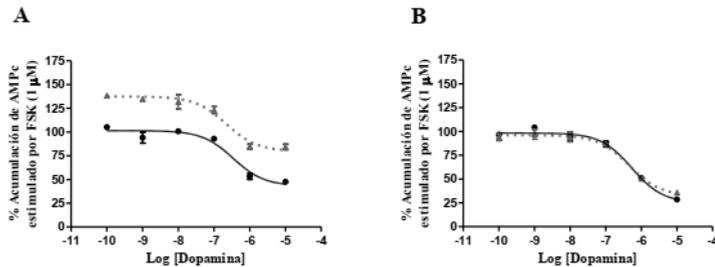


Figura 39. Imagen de estudios previos en la que se representan curvas concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor D₂ dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK (1 μM) dependiente de G_{i/o} solo (●) y en presencia del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (±) DOI (0.1 μM) (▲), en células tratadas (A) y no tratadas con doxiciclina (B) 10 ng/ml durante 24 horas (Gómez, 2017).

Con el objetivo de estudiar este efecto modulador que tiene el agonista alucinógeno, el cruzamiento de la señal que se produce entre ambos receptores y a qué nivel de la cascada de señalización se produce el acoplamiento de una vía con la otra, se realizaron ensayos funcionales de medición de AMPc en los que se trataron las células con inhibidores de distintas proteínas de la cadena de transducción (**Tabla 11** y **Figura 40**).

Tabla 11. Inhibidores utilizados para el estudio de la señalización intracelular cruzada del heterodímero D₂/5-HT_{2A} y su diana de actuación.

COMPUESTO INHIBIDOR	DIANA SOBRE LA QUE ACTÚA
Toxina Pertussis	G _i
YM-254890	G _q
Compuesto 48/80	PLC
Ro32-432	PKC
PKI 14-22	PKA
BAPTA	Calcio
Tapsigargina	Ca ²⁺ ATPasa del retículo endoplasmático

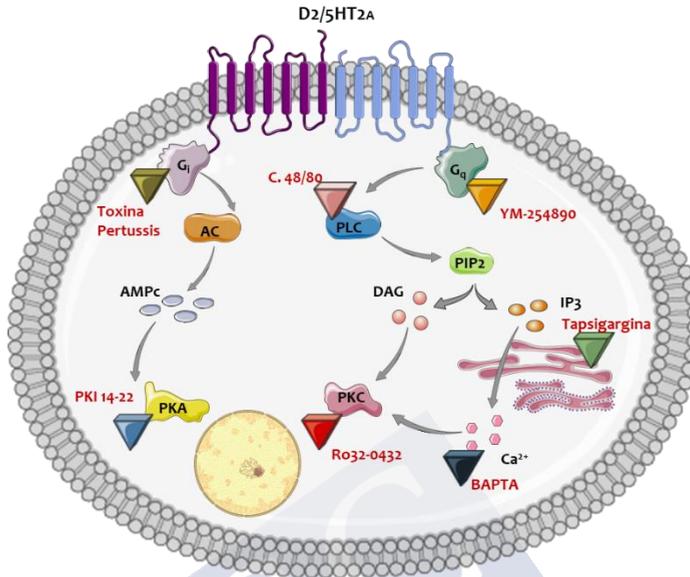


Figura 40. Esquema de las vías de señalización y los diferentes inhibidores de proteínas de la cascada de transducción. Imagen realizada por la doctoranda.

2.2.1 El efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (\pm) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂, es independiente de la inhibición de la proteína G_{i/o} por la toxina pertussis.

Se utilizó la toxina *pertussis* para inhibir el efecto de la proteína G_i acoplada al receptor D₂ para comprobar su implicación directa en el efecto modulador del agonista (\pm) DOI.

Para ello, en primer lugar, se optimizó la concentración de la toxina y el tiempo de incubación necesarios para inhibir el efecto de la proteína G_i.

Se construyeron curvas concentración-respuesta del inhibidor durante diferentes tiempos (**Figura 41** y **Tabla 12**). Se seleccionó una concentración de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ y una incubación de dos horas.

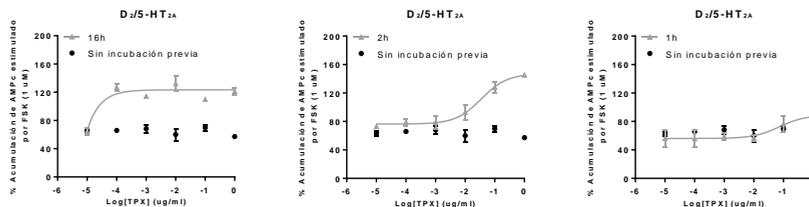


Figura 41. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por la toxina *pertussis* en presencia de dopamina 1 μM sin incubación previa (●) y a diferentes tiempos de incubación (16, 2 y 1 hora) (▲) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de un experimento realizado por triplicados.

Tabla 12. Potencia (EC₅₀) de la toxina *pertussis* en la acumulación de AMPc a diferentes tiempos en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de un experimento realizado por duplicados.

	SIN INCUBACIÓN PREVIA	INCUBACIÓN 16H	INCUBACIÓN 2H	INCUBACIÓN 1H
EC ₅₀ (μg/ml)	-	-	0.035 ± 1.6	0.073 ± 4.1

Una vez optimizadas las condiciones del inhibidor, se construyeron curvas concentración-respuesta de dopamina en presencia del agonista alucinógeno (±) DOI 0.1 μM y se incubaron en ausencia y en presencia de la toxina (**Figura 42**).

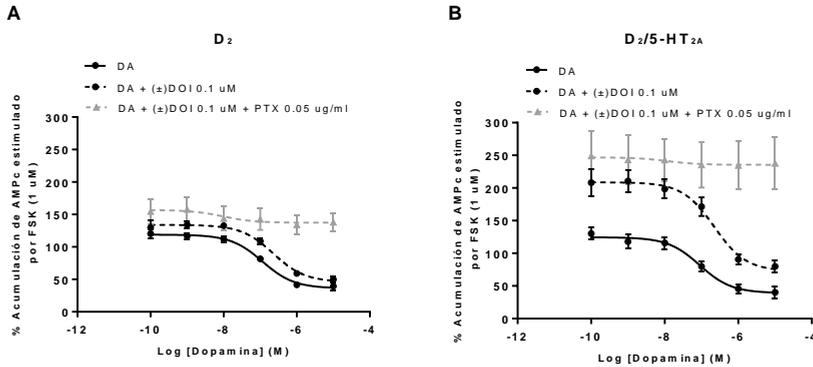


Figura 42. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por el agonista D_2 dopamina, en ausencia (—●—), en presencia del agonista alucinógeno 5-HT $_{2A}$, (\pm) DOI 0.1 μ M (---●---) y, adicionalmente, en presencia de la toxina *pertussis* 0.05 μ g/ml (---▲---) en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (B). Se representa la media \pm EEM de cinco experimentos independientes realizados por triplicados.

La toxina *pertussis* inhibió la señalización de la dopamina por completo a través del receptor D_2 , impidiendo la disminución de AMPc con valores de respuesta máxima de $222\% \pm 16$ en células que solo expresan D_2 y $245\% \pm 17$ en células que expresan el heterodímero (Tabla 13). Sin embargo, el efecto de modulación del agonista (\pm) DOI no se vio modificado en presencia del inhibidor.

Tabla 13. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{FSK}) de la dopamina (DA) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia del agonista alucinógeno 5-HT $_{2A}$ (\pm) DOI 0.1 μ M y la toxina *pertussis* (PTX) 0.05 μ g/ml en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de cinco experimentos independientes realizados por triplicados.

COMPUESTOS	D_2		$D_2/5\text{-HT}_{2A}$	
	EC_{50} (nM)	E_{FSK} (%)	EC_{50} (nM)	E_{FSK} (%)
DA	145 ± 2.2	112 ± 6.6	93.6 ± 2.8	125 ± 8.6
DA + (\pm) DOI	212 ± 2.0	146 ± 6.2	219 ± 1.9	209 ± 8.8
DA + (\pm) DOI + PTX	41.7 ± 4.3	222 ± 16	285 ± 33	245 ± 17

2.2.2 La inhibición de la proteína G_q por el compuesto YM-254890 revirtió el efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (\pm) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂.

Con el fin de comprobar la implicación de la proteína G_q en el efecto modulador del agonista (\pm) DOI se utilizó el inhibidor YM-254890.

Se optimizó el tiempo de incubación y la concentración de compuesto necesario para inhibir el efecto de la proteína G_q , para lo cual se construyeron curvas concentración-respuesta de este y se incubaron a diferentes tiempos (Figura 43 y Tabla 14).

Se observó que el efecto del inhibidor no variaba a lo largo del tiempo, por lo que se seleccionaron unas condiciones de tratamiento de 50 nM sin incubación previa para realizar los ensayos posteriores.

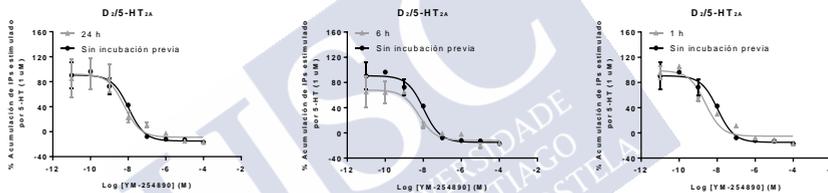


Figura 43. Curvas concentración-respuesta de acumulación de IPs del compuesto YM-254890 estimulado por serotonina 1 μ M sin incubación previa (\bullet) y a diferentes tiempos de incubación (24, 6 y 1 hora) (\blacktriangle) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de un experimento realizado por duplicados.

Tabla 14. Potencia (EC_{50}) de YM-254890 en la acumulación de IPs a diferentes tiempos en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de un experimento realizado por duplicados.

	SIN INCUBACIÓN PREVIA	INCUBACIÓN 24H	INCUBACIÓN 6H	INCUBACIÓN 1H
EC_{50} (nM)	10.5 \pm 1.4	6.2 \pm 1.9	6 \pm 1.8	2.4 \pm 1.5

Para comprobar el efecto del inhibidor en la acumulación de IPs, se construyeron curvas concentración-respuesta del agonista (\pm) DOI en ausencia y presencia del compuesto YM-254890 50 nM y se observó que la

señalización a través de proteína G_q se inhibía por completo (**Figura 44** y **Tabla 15**).

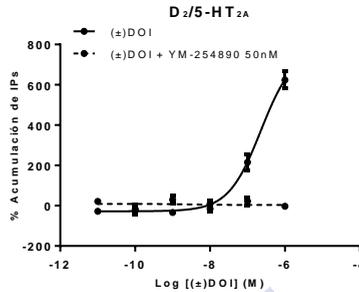


Figura 44. Curvas concentración-respuesta de acumulación de IPs inducidos por el agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI, en ausencia (—●—) y en presencia del compuesto YM-254890 50 nM (---●---) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de un experimento realizado por triplicados.

Tabla 15. Potencia (EC₅₀) de (±) DOI en ausencia y presencia del inhibidor YM-254890 50 nM en la acumulación de IPs en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de un experimento realizado por triplicados.

	(±) DOI	(±) DOI + YM-254890 (50 nM)
EC ₅₀ (nM)	228 ± 1.3	-

Con el fin de estudiar el efecto modulador del agonista (±) DOI sobre la señalización de dopamina, se construyeron curvas concentración-respuesta del agonista de D₂ en ausencia y presencia de (±) DOI 0.01 μM y tratadas con el inhibidor de G_q (**Figura 45**).

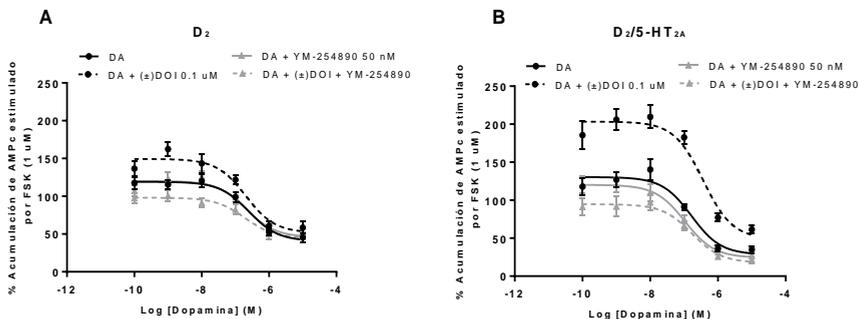


Figura 45. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por el agonista D_2 dopamina, en ausencia (—●—), en presencia del agonista alucinógeno $5-HT_{2A}$, (\pm) DOI 0.1 μM (—●—), en presencia del compuesto YM-254890 50 nM (—▲—) y en presencia de (\pm) DOI 0.1 μM y del compuesto YM-254890 50 nM (—▲—) en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (B). Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

Se observó una reversión estadísticamente significativa (p valor = 0,0035, test *t de Student*) del efecto modulador de (\pm) DOI en las células que expresan el heterodímero disminuyendo los valores de respuesta máxima de $205\% \pm 13$ en ausencia del inhibidor a $126\% \pm 5.8$ con el tratamiento de YM254890, siendo esta respuesta similar a la de la dopamina en ausencia del agonista (\pm) DOI ($133\% \pm 8.3$) (Tabla 16).

Tabla 16. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{FSK}) de la dopamina (DA) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia del agonista alucinógeno $5-HT_{2A}$ (\pm) DOI 0.1 μM y el inhibidor de G_q YM-254890 (YM) 50 nM en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados. ** p valor <0.01 (test *t de Student*).

COMPUESTOS	D_2		$D_2/5-HT_{2A}$	
	EC_{50} (nM)	E_{FSK} (%)	EC_{50} (nM)	E_{FSK} (%)
DA	234 ± 1.2	119 ± 5.8	207 ± 2.0	133 ± 8.3
DA + (\pm) DOI	216 ± 1.2	150 ± 6.6	391 ± 2.6	$205 \pm 13^{**}$
DA + YM	153 ± 1.1	118 ± 6.0	105 ± 1.5	133 ± 8.3
DA + (\pm) DOI + YM	233 ± 1.3	98.3 ± 5.1	166 ± 4.0	$126 \pm 5.8^{**}$

2.2.3 La inhibición de la fosfolipasa C por el compuesto 48/80 revirtió el efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (\pm) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂.

Una vez confirmado que el efecto depende de la vía de señalización mediada por G_q se estudió la implicación de la PLC.

Para ello, primero se optimizaron las condiciones de uso del compuesto inhibidor 48/80, se construyeron curvas concentración-respuesta durante distintos tiempos de incubación y se midió la acumulación de IPs (**Figura 46**). Se observó que el efecto del inhibidor era óptimo cuando se trataba las células sin incubación previa a una concentración de 30 μ M (**Tabla 17**).

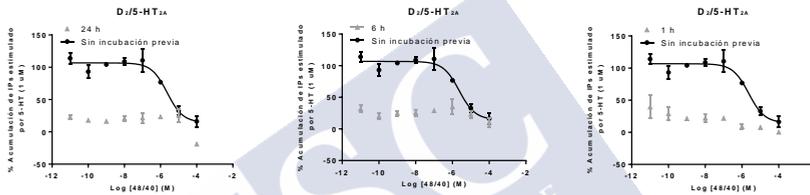


Figura 46. Curvas concentración-respuesta de acumulación de IPs del compuesto 48/80 estimulado por serotonina 1 μ M sin incubación previa (\bullet) y a diferentes tiempos de incubación (24, 6 y 1 hora) (\blacktriangle) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de un experimento realizado por duplicados.

Tabla 17. Potencia (EC₅₀) del compuesto 48/80 en la acumulación de IPs a diferentes tiempos en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de un experimento realizado por duplicados.

	SIN INCUBACIÓN PREVIA	INCUBACIÓN 24H	INCUBACIÓN 6H	INCUBACIÓN 1H
EC ₅₀ (μ M)	2.3 \pm 1.6	-	-	-

Además, se comprobó que la acumulación de IPs estimulada por (\pm) DOI se inhibía en presencia del compuesto 48/80 a una concentración de 30 μ M (**Figura 47** y **Tabla 18**).

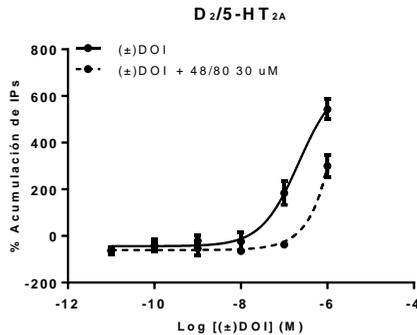


Figura 47. Curvas concentración-respuesta de acumulación de IPs inducidos por el agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI, en ausencia (●) y en presencia del compuesto 48/80 30 µM (●) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de un experimento realizado por triplicados.

Tabla 18. Potencia (EC₅₀) de (±) DOI en ausencia y presencia del compuesto 48/80 30 µM en la acumulación de IPs en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de un experimento realizado por triplicados.

	(±) DOI	(±) DOI + C-48/80 (30 µM)
EC ₅₀ (nM)	217 ± 1.4	-

Con el fin de estudiar el efecto modulador del agonista (±) DOI sobre la señalización de dopamina, se construyeron curvas concentración-respuesta del agonista de D₂ en ausencia y presencia de (±) DOI 0.01 µM y tratadas con el compuesto 48/80 a 30 µM (**Figura 48**).

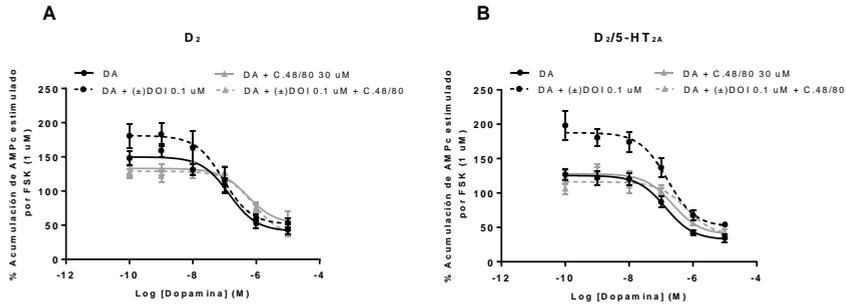


Figura 48. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por el agonista D_2 dopamina, en ausencia (●), en presencia del agonista alucinógeno 5-HT $_{2A}$, (\pm) DOI 0.1 μ M (◐), en presencia del compuesto 48/80 30 μ M (▲) y en presencia de (\pm) DOI 0.1 μ M y del compuesto 48/80 30 μ M (◑) en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (B). Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

Se observó una reversión estadísticamente significativa (p valor EC_{50} = 0.0178 y p valor E_{FSK} = 0.0441, test *t de Student*) del efecto modulador de (\pm) DOI en las células que expresan el heterodímero disminuyendo los valores de respuesta máxima de 187% \pm 10 en ausencia del inhibidor a 116% \pm 7.3 con el tratamiento del compuesto 48/80, siendo esta respuesta similar a la de la dopamina en ausencia del agonista (\pm) DOI (126% \pm 6.3) (Tabla 19).

Tabla 19. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{FSK}) de la dopamina (DA) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia del agonista alucinógeno 5-HT $_{2A}$ (\pm) DOI 0.1 μ M y el inhibidor de PLC compuesto 48/80 30 μ M en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados. * p valor <0.05 (test *t de Student*).

COMPUESTOS	D_2		$D_2/5\text{-HT}_{2A}$	
	EC_{50} (nM)	E_{FSK} (%)	EC_{50} (nM)	E_{FSK} (%)
DA	133 \pm 1.8	150 \pm 7.6	178 \pm 1.1	126 \pm 6.3
DA + (\pm) DOI	109 \pm 1.5	186 \pm 7.7	139 \pm 1.4*	187 \pm 10*
DA + 48/80	621 \pm 3.0	133 \pm 8.0	255 \pm 1.4	128 \pm 6.6
DA + (\pm) DOI + 48/80	846 \pm 1.8	129 \pm 5.5	644 \pm 1.7*	116 \pm 7.3*

2.2.4 El efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (±) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂ es independiente del calcio intracelular.

Con el objetivo de estudiar la implicación del calcio intracelular en la modulación de la señal de la dopamina por (±) DOI, se llevaron a cabo ensayos con el quelante de calcio el ácido 1,2 bis (2-animofenoxi) etano-N,N,N',N' tetraacético (BAPTA) y con el inhibidor de la Ca²⁺ ATPasa del retículo endoplasmático (tapsigargina), que evita que el calcio sea captado por el retículo aumentándolo en el citosol.

Para ello, primero se optimizaron las condiciones de uso de cada uno de estos compuestos. Se incubaron distintas concentraciones de BAPTA (1 o 2 mM) en presencia del agonista (±) DOI y se midió la movilización de calcio (**Figura 49**). Se observó que tras una incubación de 1 hora con el quelante a una concentración 1 mM disminuía la señalización a través de calcio mediada por (±) DOI hasta niveles basales, por lo que se seleccionaron estas condiciones.

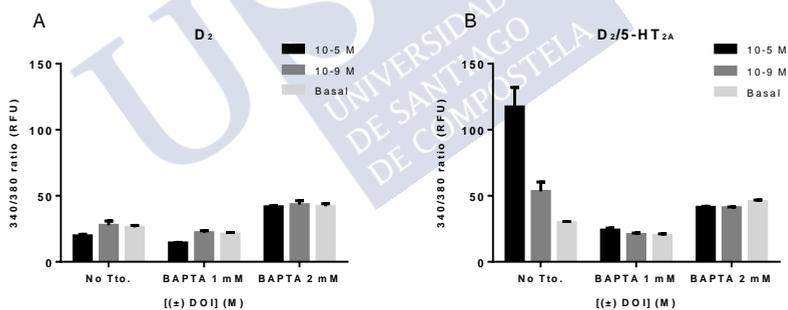


Figura 49. Movilización de calcio en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (B) incubadas con el quelante de calcio, BAPTA 1 mM o 2 mM, en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI. Se representa la media ± EEM de un experimento representativo realizado por triplicados.

Por otro lado, se optimizó la concentración de tapsigargina en ausencia y presencia del quelante de calcio, BAPTA. Para ello se estudiaron distintas concentraciones de tapsigargina en presencia de (±) DOI 0.01 μM y en ausencia o presencia de BAPTA 1 mM (**Figura 50**).

Se observó que aumentaba la señalización de calcio a medida que la concentración de tapsigargina era mayor, sin embargo, disminuye en presencia del quelante BAPTA a 1 mM. Además, se observó un aumento en la movilización de calcio estadísticamente significativo con un intervalo del 99% de confianza (p valor= 0.005, test *t de Student*) entre el control basal en presencia de BAPTA 1 mM y el tratamiento con tapsigargina 10 μ M y BAPTA 1 mM, de manera que la tapsigargina tiene capacidad a esa concentración de movilizar calcio aún a pesar del efecto quelante del BAPTA. Por ello, se seleccionaron diferentes condiciones para estudiar este efecto: tapsigargina 1 y 10 μ M en ausencia y presencia de BAPTA 1 mM.

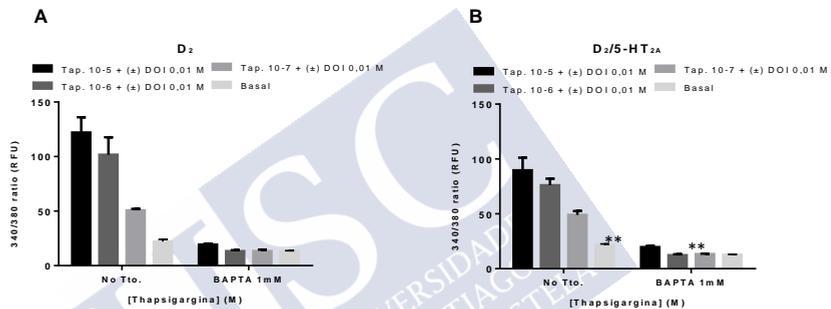


Figura 50. Movilización de calcio en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (B) incubadas con tapsigargina a distintas concentraciones y en presencia de (\pm) DOI 0.1 μ M, pretratadas o no con BAPTA 1 mM. Se representa la media \pm EEM de un experimento representativo realizado por triplicados. ** p valor <0.01 (test *t de Student*).

Una vez optimizadas las condiciones de empleo de los inhibidores, se estudió primero el efecto del quelante BAPTA individualmente en el efecto modulador del agonista (\pm) DOI en la respuesta de la dopamina sobre el receptor D₂. Para ello se construyeron curvas concentración-respuesta de dopamina en ausencia y presencia de (\pm) DOI 0.01 μ M y se trataron previamente 1 hora con BAPTA 1 mM (**Figura 51**).

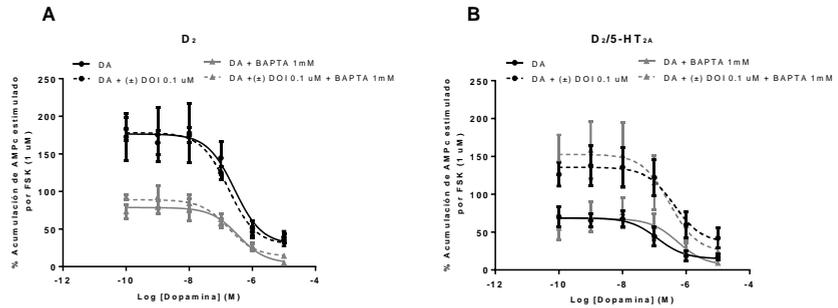


Figura 51. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por el agonista D_2 dopamina, en ausencia (●), en presencia del agonista alucinógeno 5-HT $_{2A}$, (±) DOI 0.1 μ M (●), en presencia de BAPTA 1 mM (▲) y en presencia de (±) DOI 0.1 μ M y BAPTA 1 mM (▲) en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (B). Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizados por triplicados.

Se observó que el quelante de calcio produce una disminución de los niveles totales de AMPc cuando se expresa individualmente el receptor D_2 , sin embargo, el efecto modulador de (±) DOI es independiente del tratamiento con BAPTA 1 mM cuando se expresa el heterodímero (Tabla 20). El estudio estadístico de los datos demostró que no hay diferencias significativas entre los valores analizados.

Tabla 20. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{FSK}) de la dopamina (DA) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia del agonista alucinógeno 5-HT $_{2A}$ (±) DOI 0.1 μ M y el quelante de calcio BAPTA 1 mM en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizados por triplicados.

COMPUESTOS	D_2		$D_2/5-HT_{2A}$	
	EC_{50} (nM)	E_{FSK} (%)	EC_{50} (nM)	E_{FSK} (%)
DA	319 \pm 2.3	175 \pm 15	94.7 \pm 3.3	93.7 \pm 12
DA + (±) DOI	657 \pm 4.7	177 \pm 14	296 \pm 4.7	153 \pm 16
DA + BAPTA	770 \pm 2.0	78.8 \pm 5.7	378 \pm 1.9	70.2 \pm 4.6
DA + (±) DOI + BAPTA	234 \pm 2.2	89.1 \pm 7.3	447 \pm 2.4	135 \pm 12

Se continuó con el estudio del efecto modulador del agonista (\pm) DOI en la respuesta de la dopamina sobre el receptor D_2 y cómo afecta la alteración de los niveles de calcio, en este caso combinando la tapsigargina y el BAPTA. Para ello se construyeron curvas concentración-respuesta de dopamina en ausencia y presencia de (\pm) DOI 0.01 μ M y se trataron previamente con tapsigargina 1 μ M (Figura 52) o 10 μ M (Figura 53) en ausencia o presencia de BAPTA 1 mM.

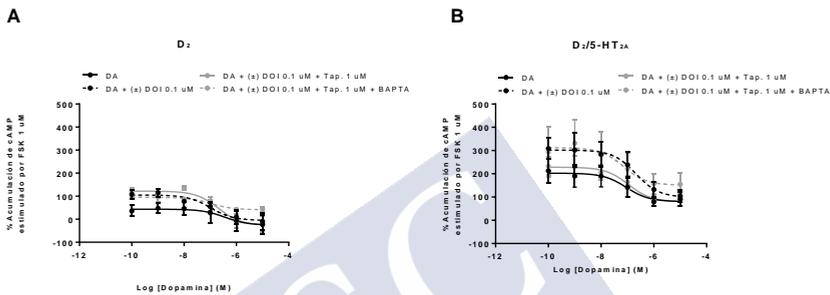


Figura 52. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por el agonista D_2 dopamina, en ausencia (\bullet), en presencia del agonista alucinógeno 5-HT $_{2A}$, (\pm) DOI 0.1 μ M (\bullet) en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (B). Adicionalmente, se trataron las células con tapsigargina 1 μ M (\bullet) y tapsigargina 1 μ M y BAPTA 1 mM (\bullet). Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

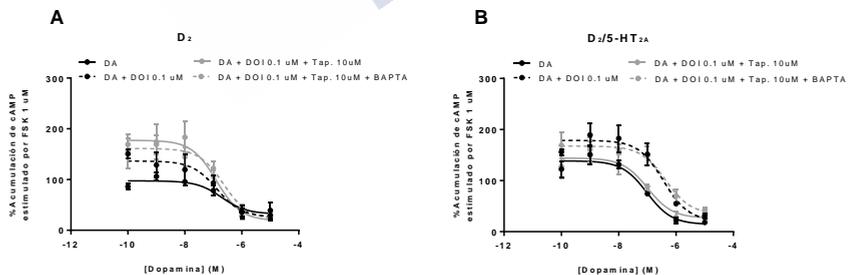


Figura 53. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por el agonista D_2 dopamina, en ausencia (\bullet), en presencia del agonista alucinógeno 5-HT $_{2A}$, (\pm) DOI 0.1 μ M (\bullet) en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (B). Adicionalmente, se trataron las células con tapsigargina 10 μ M (\bullet) y tapsigargina 10 μ M y BAPTA 1 mM (\bullet). Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las condiciones estudiadas, ni con el tratamiento de tapsigargina 1 o 10 μM por sí solo, ni en el tratamiento junto con BAPTA (**Tabla 21** y **22**). El efecto modulador de (\pm) DOI es independiente de la inhibición de calcio por el quelante BAPTA o por el inhibidor de la Ca^{2+} ATPasa del retículo endoplasmático, la tapsigargina.

Tabla 21. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{FSK}) de la dopamina (DA) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A} (\pm) DOI 0.1 μM y la tapsigargina 1 μM con presencia o ausencia de BAPTA 1 mM en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

COMPUESTOS	D ₂		D ₂ /5-HT _{2A}	
	EC ₅₀ (nM)	E _{FSK} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{FSK} (%)
DA	325 \pm 9.0	84.4 \pm 13	77.9 \pm 2.0	207 \pm 11
DA + (\pm) DOI	101 \pm 3.2	105 \pm 12	386 \pm 2.0	264 \pm 13
DA + (\pm) DOI + Tap 1 μM	249 \pm 2.1	122 \pm 11	184 \pm 3.0	227 \pm 15
DA + (\pm) DOI + Tap 1 μM + BAPTA	172 \pm 2.0	95.6 \pm 18	341 \pm 3.0	225 \pm 22

Tabla 22. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de la dopamina (DA) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A} (\pm) DOI 0.1 μM y la tapsigargina 10 μM con presencia o ausencia de BAPTA 1 mM en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

COMPUESTOS	D ₂		D ₂ /5-HT _{2A}	
	EC ₅₀ (nM)	E _{FSK} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{FSK} (%)
DA	253 \pm 2.5	120 \pm 9.0	94.9 \pm 1.8	132 \pm 9.0
DA + (\pm) DOI	147 \pm 2.4	163 \pm 15	341 \pm 2.3	182 \pm 14
DA + (\pm) DOI + Tap 10 μM	129 \pm 1.9	212 \pm 915	175 \pm 2.7	144 \pm 15
DA + (\pm) DOI + Tap 10 μM + BAPTA	322 \pm 1.7	167 \pm 8.8	400 \pm 2.1	152 \pm 10

2.2.5 El efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (\pm) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂ es independiente de la inhibición de la proteína Quinasa C por el compuesto Ro32-0432.

Con el fin de estudiar la proteína quinasa C, implicada en la vía de señalización del receptor 5-HT_{2A} acoplada a la proteína G_q, se empleó el inhibidor específico Ro32-0432 a una concentración de 10 μ M y se incubó durante 24 horas previas al ensayo (Matsumoto *et al.*, 2013).

Con estas condiciones, se evaluó la capacidad de Ro32-0432 de inhibir la acumulación de IPs estimulada por el agonista alucinógeno (\pm) DOI (Figura 54 y Tabla 23). Se observó que el compuesto tiene capacidad inhibitoria sobre la acumulación del IPs.

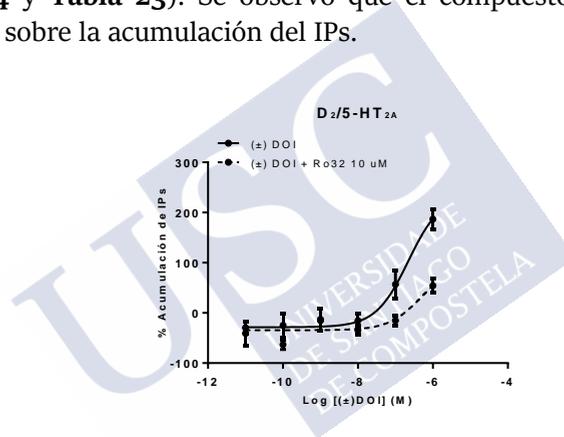


Figura 54. Curvas concentración-respuesta de acumulación de IPs inducidos por el agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (\pm) DOI, en ausencia (—●—) y en presencia del compuesto Ro32-0432 10 μ M (---●---) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de un experimento realizado por triplicados.

Tabla 23. Potencia (EC₅₀) de (\pm) DOI en ausencia y presencia del inhibidor Ro32-0432 10 μ M en la acumulación de IPs en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de un experimento realizado por triplicados.

	(\pm) DOI	(\pm) DOI + Ro32-0432 (10 μ M)
EC ₅₀ (nM)	222 \pm 1.6	496 \pm 6.2

Por otro lado, conociendo la capacidad de la forskolina de estimular la actividad de la PKA a través de AC (Liu and Simon, 1996a), y por tratarse de una quinasa similar, se estudió la capacidad de este compuesto de alterar los niveles totales de AMPc durante el tratamiento de las células con el inhibidor de PKC (**Figura 55**). Se comprobó que, en este caso, la forskolina y, por tanto, la activación de la AC no afecta a la inhibición de la PKC por el compuesto Ro32-0432 en la acumulación de AMPc.

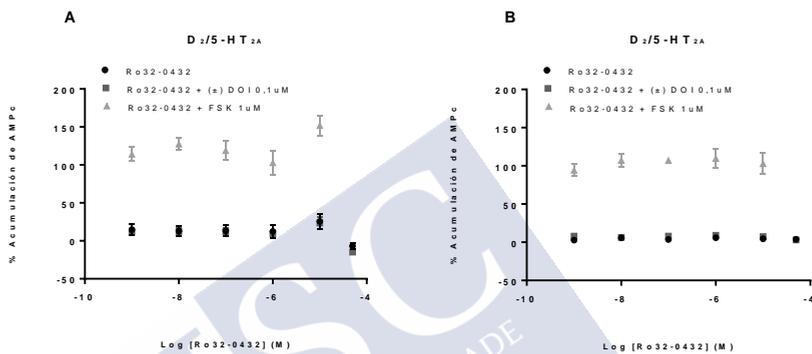


Figura 55. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por el compuesto Ro32-0432 (●) incubado durante 24 horas (A) o sin incubación previa (B), en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI 0.1 μM (■) o en presencia de forskolina 1 μM (▲) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de dos experimentos independientes realizados por duplicados.

Para estudiar el efecto modulador del agonista (±) DOI en la respuesta de la dopamina sobre el receptor D₂, se construyeron curvas concentración-respuesta de dopamina en ausencia y presencia de (±) DOI 0.01 μM y se trataron con el inhibidor de PKC, el compuesto Ro32-0432 a 10 μM 24 horas antes del ensayo (**Figura 56**).

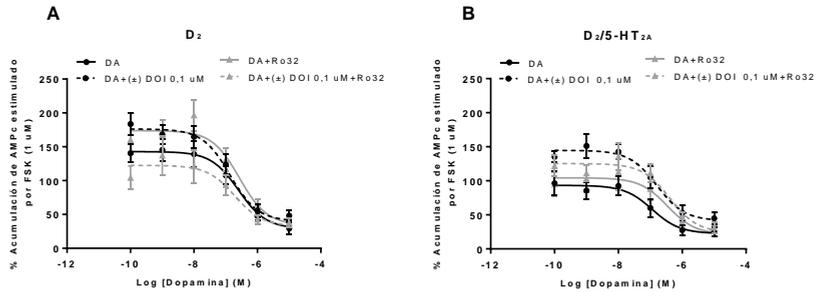


Figura 56. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducidas por el agonista D_2 dopamina, en ausencia (—●—), en presencia del agonista alucinógeno 5-HT $_{2A}$, (\pm) DOI 0.1 μ M (—●—), en presencia del compuesto Ro32-0432 10 μ M (—▲—) y en presencia de (\pm) DOI 0.1 μ M y del compuesto Ro32-0432 10 μ M (—▲—) en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h (B). Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

Se observó que el efecto modulador de (\pm) DOI es independiente de la inhibición de la PKC por su inhibidor específico Ro32-0432 (Tabla 24). El estudio estadístico de los datos demostró que no hay diferencias significativas entre los valores analizados.

Tabla 24. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{FSK}) de la dopamina (DA) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia del agonista alucinógeno 5-HT $_{2A}$ (\pm) DOI 0.1 μ M y el inhibidor de PKC Ro32-0432 (Ro32) 10 μ M en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

COMPUESTOS	D_2		$D_2/5-HT_{2A}$	
	EC_{50} (nM)	E_{FSK} (%)	EC_{50} (nM)	E_{FSK} (%)
DA	171 \pm 1.8	138 \pm 7.4	119 \pm 1.7	95.2 \pm 5.1
DA + (\pm) DOI	118 \pm 1.5	172 \pm 7.1	200 \pm 1.5	145 \pm 5.4
DA + Ro32	342 \pm 2.2	165 \pm 12	492 \pm 2.1	109 \pm 7.1
DA + (\pm) DOI + Ro32	196 \pm 3.3	113 \pm 9.4	476 \pm 1.9	128 \pm 7.7

2.2.6 La inhibición de la proteína quinasa A por el compuesto PKI14-22 revirtió el efecto modulador del agonista de 5-HT_{2A}, (±) DOI, sobre la señalización de la dopamina en el receptor D₂.

Continuando con el estudio de las vías de señalización y con el objetivo de conocer a qué nivel se produce un cruzamiento entre ambas que explique el efecto modulador del (±) DOI sobre la respuesta de la dopamina, se evaluó la implicación de la proteína quinasa A. La PKA está implicada en la cascada de señalización de AMPc y se activa cuando aumenta este segundo mensajero (Skalhegg and Tasken, 2000). Para su estudio se utilizó el inhibidor específico, el compuesto PKI 14-22 a una concentración de 40 μM y se incubó durante 3 horas (Cheng *et al.*, 2017).

En primer lugar, se evaluó cómo afectaba este inhibidor a la vía de señalización del receptor 5-HT_{2A} acoplado a G_q y para ello se construyeron curvas concentración-respuesta del agonista (±) DOI en ausencia y presencia de PKI 14-22 40 μM (Figura 57 y Tabla 25). No se observó modificación de la respuesta en la acumulación de especies de IPs en presencia del inhibidor de PKA.

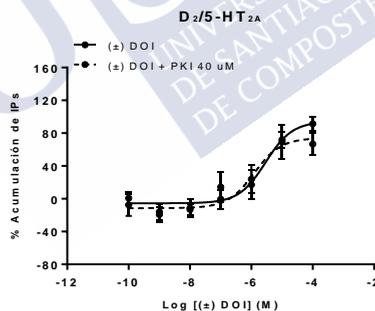


Figura 57. Curvas concentración-respuesta de acumulación de IPs inducidos por el agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI, en ausencia (—●—) y en presencia del compuesto PKI14-22 40 μM (-●-) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de dos experimentos independientes realizado por duplicados.

Tabla 25. Potencia (EC_{50}) de (\pm) DOI en ausencia y presencia del inhibidor PKI 14-22 $40 \mu\text{M}$ en la acumulación de IPs en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h . Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizado por duplicados.

	(\pm) DOI	(\pm) DOI + PKI 14-22 ($40 \mu\text{M}$)
EC_{50} (nM)	2.91 ± 1.9	1.24 ± 2.1

A continuación, se estudió si el propio inhibidor tenía capacidad de modificar la acumulación de IPs (**Figura 58**) o de AMPc (**Figura 59**). Para ello se construyeron curvas concentración-respuesta de PKI 14-22 y se estimuló con el agonista (\pm) DOI $0.01 \mu\text{M}$. Se comprobó que el compuesto no tenía capacidad de modificar la acumulación de IPs ni AMPc.

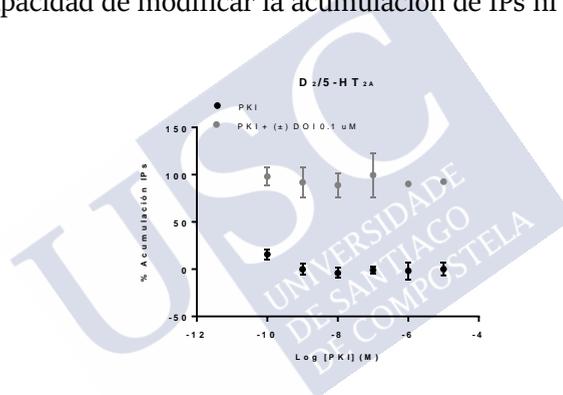


Figura 58. Curvas concentración-respuesta de acumulación de IPs inducidos por el compuesto PKI14-22, en ausencia (●) y en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (\pm) DOI $0.1 \mu\text{M}$ (●) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h . Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizado por duplicados.

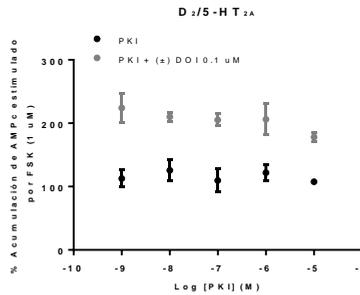


Figura 59. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por el compuesto PKI14-22, en ausencia (—●—) y en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI 0.1 μM (—●—) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media ± EEM de un experimento realizado por triplicados.

Por último, una vez comprobado que el inhibidor no afectaba a la acumulación de AMPc y con el fin de estudiar el efecto modulador del agonista (±) DOI sobre la señalización de dopamina, se construyeron curvas concentración-respuesta del agonista de D₂ en ausencia y presencia de (±) DOI 0.01 μM y tratadas con PKI 14-22 40 μM tres horas previas al ensayo (Figura 60).

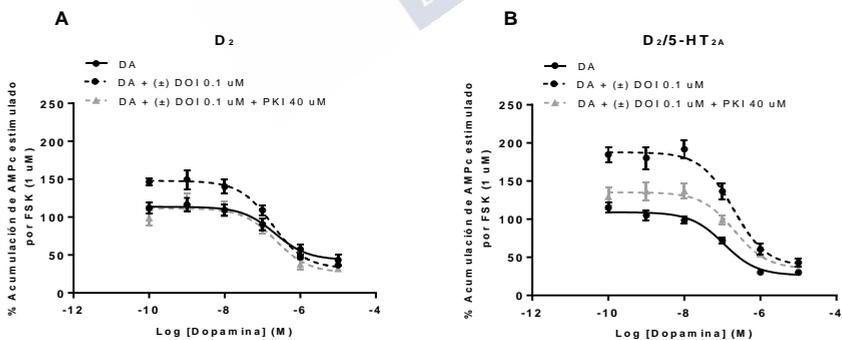


Figura 60. Curvas concentración-respuesta de acumulación de AMPc inducido por el agonista D₂ dopamina, en ausencia (—●—), en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI 0.1 μM (—●—) y en presencia de (±) DOI 0.1 μM y el compuesto PKI14-22 40 μM (—▲—) en células no tratadas (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante

24h (B). Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados.

Se observó una reversión estadísticamente significativa (p valor = 0.047, test *t de Student*) del efecto modulador de (\pm) DOI en las células que expresan el heterodímero disminuyendo los valores de respuesta máxima de 188% \pm 8.3 en ausencia del inhibidor a 135% \pm 7.0 con el tratamiento del inhibidor PKI 14-22, siendo esta respuesta similar a la de la dopamina en ausencia del agonista (\pm) DOI (112% \pm 5.4) (**Tabla 26**).

Tabla 26. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{FSK}) de la dopamina (DA) en la acumulación de AMPc en ausencia o presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A} (\pm) DOI 0.1 μ M y el inhibidor de PKA, PKI 14-22 40 μ M en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicados. * p valor <0.05 (test *t de Student*).

COMPUESTOS	D ₂		D ₂ /5-HT _{2A}	
	EC ₅₀ (nM)	E _{FSK} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{FSK} (%)
DA	173 \pm 3,9	115 \pm 9,8	110 \pm 1,6	112 \pm 5,4
DA + (\pm) DOI	185 \pm 1,7	148 \pm 7,8	198 \pm 1,6	188 \pm 8,3*
DA + (\pm) DOI + PKI	244 \pm 2,1	112 \pm 7,2	253 \pm 2,0	135 \pm 7,0*

2.2.7 La actividad de la proteína quinasa A se vio modificada en presencia del agonista alucinógeno de 5-HT_{2A}, (\pm) DOI.

Tras los estudios funcionales realizados sobre la cascada intracelular de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} mediante el uso de inhibidores específicos, se focalizó el trabajo en el estudio de la proteína quinasa A (PKA) como proteína que interfiere en el efecto modulador del agonista (\pm) DOI sobre la señal de la dopamina en el receptor D₂. Para ello, se realizaron tres tipos de ensayos:

1) ensayos de medida de la actividad de PKA mediante métodos colorimétricos con el fin de comprobar si esta varía en presencia del agonista alucinógeno (\pm) DOI.

2) ensayos de *western blot* para comprobar si la expresión de la PKA total y activada (fosforilada) variaba en presencia del agonista alucinógeno (\pm) DOI y de su inhibidor específico, PKI 14-22.

3) ensayos de medida de la activación del elemento modulador de respuesta a AMPc (CREB), sustrato específico de la PKA, mediante la tecnología Alpha[®].

2.2.7.1 *La actividad de la PKA aumentó en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (\pm) DOI.*

Con el fin de conocer si la estimulación con el agonista alucinógeno (\pm) DOI modula la actividad de la PKA se utilizó un kit comercial basado en un inmunoensayo capaz de detectar la PKA activada mediante métodos colorimétricos.

Se observó que la actividad de la PKA, medida como la capacidad de esta de fosforilar un sustrato específico, aumentó un 20% en presencia del agonista alucinógeno (**Figura 61**).

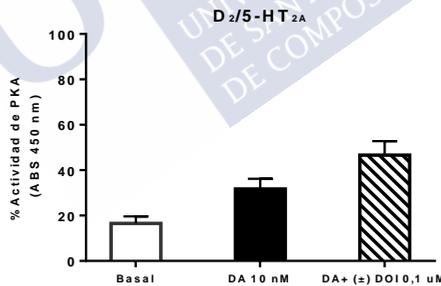


Figura 61. Activación de la proteína quinasa A en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h incubadas con el agonista D₂ dopamina (10 nM) y en ausencia o presencia de (\pm) DOI 0.1 μ M. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

2.2.7.2 La fosforilación de la PKA aumentó en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI.

Una vez confirmado que la actividad de PKA varía en presencia de (±) DOI, se estudió si la expresión de la PKA fosforilada (activada) también se veía alterada. Para ello se llevaron a cabo ensayos de *western blot* con lisados celulares estimulados con dopamina y en presencia o ausencia del alucinógeno (±) DOI 0.01 μM y del inhibidor de PKA, PKI 14-22 a una concentración de 40 μM. Se midió la expresión de la PKA total y la PKA fosforilada con anticuerpos específicos para cada caso.

Se observó una banda de unos 50 KDa correspondiente al peso molecular de la subunidad RII de la PKA (**Figura 62 A**) (*Recombinant Anti-PKA R2/PKR2 antibody [Y116] KO Tested (ab32514) | Abcam*) y de 51 kDa correspondiente a la subunidad RII fosforilada (**Figura 62 B**) (*Phospho PKA R2 (S99) antibody [E151] Recombinant (ab32390) | Abcam*).

Las muestras reveladas se densitometraron y se analizó el ratio de PKA fosforilada (fPKA) y PKA total (tPKA). Los resultados obtenidos demostraron que en presencia del alucinógeno aumenta la cantidad de PKA activada y, al tratar las células con el inhibidor, se observó una reversión estadísticamente significativa (p valor = 0.0002, test *t de Student*) de este aumento (**Figura 62 C**).

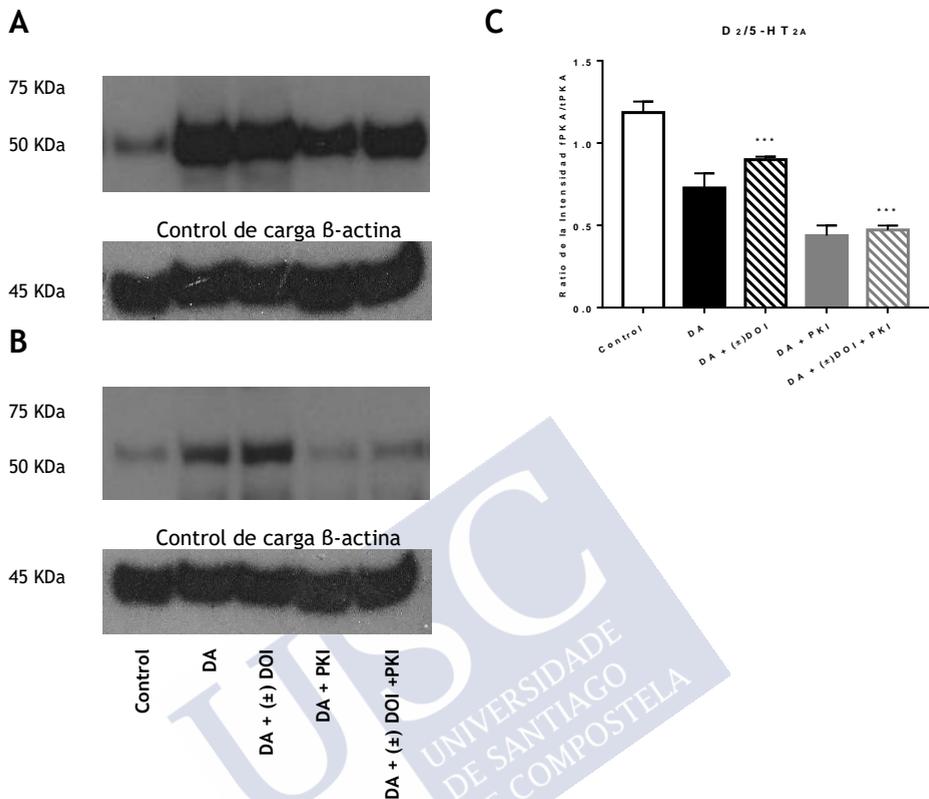


Figura 62. Western blot del lisado de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. Se utilizaron 20 μ g de muestra resultado de la estimulación de las células con Dopamina (DA) 10 nM en presencia o ausencia de (\pm) DOI 0.1 μ M y previamente tratadas o no con PKI 40 μ M. La detección se realizó con el anticuerpo anti-PKA R2/PKR2 1/10000 (A) o anti-PKA R2/PKR2 (Phospho S99) 1/1000 (B). Ambos se revelaron con el anticuerpo anti-conejo-HRP 1/5000. Se empleó β -actina como control de carga (anticuerpo anti- β -actina-HRP 1/30000). Se muestra una imagen representativa. (C) Cuantificación de la medida de intensidad de PKA fosforilada/PKA total de tres experimentos independientes. ****p* valor <0.001 (test *t* de Student).

2.2.7.3 La activación de CREB aumentó en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI.

Por último, se estudió la actividad de PKA mediante ensayos de medida de la fosforilación CREB con la tecnología Alpha[®]. Un aumento de la actividad de PKA conlleva un aumento de la fosforilación de su sustrato específico CREB en la serina 133 (Gonzalez and Montminy, 1989).

Se observó que la cantidad de CREB total varió en presencia del inhibidor de PKA, PKI 14-22 a una concentración 40 µM, de manera que la inhibición de PKA modula la expresión de CREB total disminuyéndola significativamente en ausencia (*p* valor= 0.0067, test *t* de Student) y presencia (*p* valor= 0.0122, test *t* de Student) de (±) DOI (**Figura 63**).

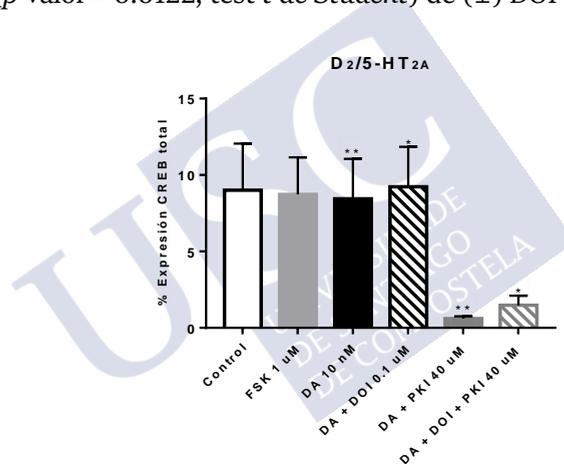


Figura 63. Representación de la expresión de CREB total en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h incubadas con el agonista D₂ dopamina 10 nM, en ausencia o presencia de (±) DOI 0.1 µM y previamente tratadas con PKI 14-22 40 µM. Se representa la media ± EEM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicados. **p* valor <0.05; ***p* valor <0.01 (test *t* de Student).

En vista de que la expresión de CREB total variaba en presencia del inhibidor de PKA, se midió la activación de CREB a través de su fosforilación en la serina 133 por PKA y se representó como el porcentaje de CREB fosforilada independientemente de la CREB total.

Se observó que en presencia del alucinógeno (\pm) DOI aumenta la fosforilación de CREB y este aumento se ve revertido en presencia del inhibidor PKI 14-22 de manera estadísticamente significativa (p valor = 0.0033, test *t de Student*) (**Figura 64**).

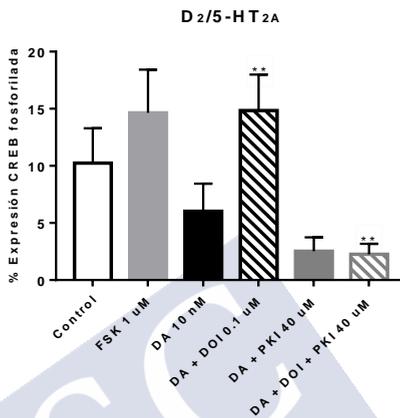


Figura 64. Representación de la expresión de CREB fosforilada en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h incubadas con el agonista D₂ dopamina 10 nM, en ausencia o presencia de (\pm) DOI 0.1 μ M y previamente tratadas con PKI 14-22 40 μ M. Se representa la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicados. ** p valor <0.01 (test *t de Student*).



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

La principal aportación de la presente tesis doctoral fue el conocimiento de la señalización cruzada intracelular del heterodímero D₂/5-HT_{2A} a través de PKA/CREB. Esta señalización cruzada modificó el efecto farmacológico de los agonistas en los receptores protoméricos respecto de los receptores monoméricos.

Los receptores D₂ y 5-HT_{2A} pertenecen a la superfamilia de GPCRs. Estos son proteínas con capacidad de interactuar con diversas moléculas intra y extracelulares que, a su vez, dan lugar a la interacción con diferentes efectores a nivel intracelular, lo que ha llevado a proponerlos como complejos alostéricos (Kenakin, 2004a; Luttrell and Kenakin, 2011). Hay múltiples mecanismos que pueden modificar la señalización canónica de estos receptores, como es el caso de la oligomerización de receptores, donde cada uno de los monómeros puede comportarse como un modulador alostérico del otro. Si bien, es importante distinguir entre el alosterismo mediado a través de un complejo macromolecular y los cambios en la señalización generados por un cruzamiento de las vías de señalización de los diferentes monómeros, lo que se conoce habitualmente como *crossstalk* (Wang, Qiao and Li, 2018). El *crossstalk* o señalización cruzada entre receptores hace referencia a la interacción o interferencia en la comunicación que puede haber entre las distintas vías de señalización en el interior de la célula cuando se activan varios GPCRs, de manera que las respuestas celulares no son aisladas, sino que puede haber interacciones entre ellas (Natarajan and Berk, 2006). Distinguir estos dos procesos puede ser complejo, pero también hay que tener en cuenta que pueden darse simultáneamente.

Un heterodímero o heterooligómero de receptores es un complejo macromolecular proteico cuaternario que tiene asociado un interactoma y su correspondiente signalosoma que es distinto respecto a las entidades monoméricas que forman ese complejo. Los efectores canónicos, como las proteínas G, parecen interactuar de manera selectiva en complejos de mayor orden que un solo receptor de membrana para modular la respuesta intracelular. Comparando con los monómeros, los dímeros u oligómeros presentan distinta afinidad por los agonistas y una eficacia diferente, unas propiedades de tráfico del receptor características, así como una mediación

de las señales al interior celular específicas. Es por ello que, los oligómeros de GPCRs exhiben un modo de activación de la señalización único y diferentes al que muestran los monómeros (Bouvier, 2001; Milligan, 2004; Palczewski, 2010).

La frecuencia y la relevancia de la oligomerización de receptores *in vivo* continúa estando bajo debate, ya que muchos de los estudios sobre oligomerización se realizan con receptores transfectados en líneas celulares, lo que puede llevar a artefactos en los resultados (Bourque *et al.*, 2020). Es por ello, que la relevancia fisiológica de los oligómeros viene dada por la identificación de estos complejos en modelos animales o estudios *ex vivo* en humanos. En nuestro caso, el heterodímero D₂/5-HT_{2A}, se ha identificado tanto en ensayos *in vitro* (Borroto-Escuela *et al.*, 2010; Łukasiewicz *et al.*, 2010) como en estudios *ex vivo* en zonas del estriado en cerebro humano (Borroto-Escuela *et al.*, 2013); describiéndose numerosos estudios que muestran una comunicación cruzada intracelular o *crossstalk* entre estos receptores (Albizu *et al.*, 2011; Łukasiewicz *et al.*, 2011; Borroto-Escuela *et al.*, 2014).

El heterodímero D₂/5-HT_{2A} está implicado en la patogenia de enfermedades psiquiátricas, como la esquizofrenia, ya que ambos receptores son las dianas principales de los fármacos antipsicóticos. Además, el efecto del antagonismo de estos receptores en los síntomas psicóticos y la co-localización de los mismos en neuronas dopaminérgicas, lleva a pensar que la modulación de este heterodímero puede ser fundamental en el tratamiento de la esquizofrenia. Por tanto, resulta de gran interés para el desarrollo de futuros nuevos antipsicóticos conocer la manera que tienen estos receptores de señalizar intracelularmente cuando se encuentran formando heterodímeros.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo se centró en el estudio a nivel funcional del cruzamiento de la señalización intracelular de los protómeros que forman el heterodímero D₂/5-HT_{2A}, con el fin de contribuir al conocimiento de este complejo macromolecular clave en el desarrollo de nuevos fármacos antipsicóticos y al conocimiento de su farmacología.

Para el desarrollo de este trabajo se empleó la línea celular HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP que expresa

constitutivamente el receptor D_2 y de manera inducible por doxiciclina el receptor 5-HT_{2A}. El empleo de esta línea celular presenta una ventaja fundamental a la hora de realizar los ensayos ya que sirve como su propio control, al permitir realizar experimentos únicamente en presencia del receptor D_2 de dopamina, o combinado con el receptor 5-HT_{2A} induciendo su expresión mediante la adición de 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas.

Está descrito que la línea celular HEK 293 expresa de manera endógena el receptor 5-HT₇ (Johnson *et al.*, 2003). El receptor 5-HT₇ es el subtipo de receptores serotoninérgicos más recientemente identificado y caracterizado y también relacionado con esquizofrenia. Aunque no se conoce su estructura cristalina, se ha estudiado su secuencia genética y los distintos tipos que se forman por *splicing* alternativo, pero todas las diferentes variantes del receptor mantienen un patrón farmacológico similar y se acoplan a la proteína G_s, que activa la adenilato ciclasa para producir el aumento de AMPc en el interior celular (Lovenberg *et al.*, 1993).

En trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación se estudió la influencia del bloqueo del receptor 5-HT₇ sobre la señalización del heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$. Se comprobó que los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₇ modulaban la señalización a través del receptor D_2 , modificando los niveles de AMPc. En concreto, el bloqueo del receptor 5-HT₇ por su antagonista específico, SB-269970, redujo de manera significativa la potencia de la dopamina para estimular el receptor D_2 (Gómez, 2017). Esto podría atribuirse a una señalización cruzada entre los receptores D_2 y 5-HT₇, pero también podría ser debido a la formación de un complejo cuaternario de orden mayor en el que participasen los tres receptores.

Con el objetivo de estudiar en detalle la influencia del receptor 5-HT₇ sobre el heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$, en primer lugar, se comprobó el efecto de los agonistas y antagonistas del receptor D_2 sobre la señalización del receptor 5-HT₇, para evaluar el posible *crossstalk* entre ambos receptores. Para los ensayos se emplearon los agonistas totales del receptor D_2 , dopamina y quinpirol, y el agonista parcial aripiprazol (*IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY*). Los agonistas totales del receptor D_2 , redujeron la capacidad de la serotonina de producir AMPc, mientras que el agonista

parcial del receptor D_2 , no tuvo efecto sobre la respuesta de la serotonina en el receptor $5-HT_7$ y no disminuyó su capacidad de producción de AMPc. Por su parte, los antagonistas del receptor D_2 empleados en este trabajo, la sulpirida y el haloperidol, tampoco modificaron la capacidad de la serotonina para producir AMPc a través del receptor $5-HT_7$. La ausencia de efecto por parte del agonista parcial del receptor D_2 en comparación con los agonistas totales, se debe a que el aripiprazol no tiene la potencia suficiente para modular los niveles totales de AMPc y contrarrestar el efecto de la serotonina. Los antagonistas, por su parte, bloquean el receptor D_2 pero no actúan sobre la producción de AMPc, por lo que tampoco se observó una modulación de los niveles de este segundo mensajero

También se comprobó que todos los agonistas del receptor D_2 estudiados disminuyeron de manera estadísticamente significativa el efecto de la serotonina a través del receptor $5-HT_7$ antagonizado por SB269970. Sin embargo, los antagonistas de D_2 no modificaron el efecto de la serotonina sobre el receptor $5-HT_7$ bloqueado por su antagonista específico SB269970.

Tras confirmar esta modulación de los niveles de AMPc por agonistas totales del receptor D_2 en la señalización del receptor $5-HT_7$, se buscó una prueba de si este efecto era dependiente de la proteína G_i . Para ello se empleó la **toxina pertussis**, que es liberada por la bacteria *Bordetella pertussis* y con capacidad de inhibir el efecto de la proteína $G_{\alpha i}$, por lo que se ha empleado ampliamente en estudios de señalización intracelular de GPCRs (Tamura *et al.*, 1982). La activación de la toxina provoca la ADP-ribosilación dependiente de NAD de la subunidad α de la proteína G que, como resultado, pierde la capacidad de unión al receptor de membrana produciendo una inhibición de la transducción de la señal al interior celular (Katada, 2012).

El tratamiento con la PTX a distintas concentraciones revirtió el efecto de la dopamina sobre la movilización de AMPc inducida por serotonina, recuperando los niveles de movilización de AMPc dependientes del receptor $5-HT_7$. Estos resultados confirmaron que el efecto modulador de la dopamina sobre la respuesta de la serotonina en presencia o ausencia del antagonista SB269970 eran dependientes de G_i .

Algunos estudios han demostrado la interacción entre distintas proteínas G en diferentes oligómeros (Rives, Vol, Fukazawa, Tinel, Trinquet, Ayoub, Shigemoto, Pin and Pré Zeau, 2009; Rebois *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2018), sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el efecto observado por los agonistas y antagonistas del receptor D₂ sobre la respuesta del receptor 5-HT₇, no se debe a una señalización cruzada oligomérica de estos receptores a través de las proteínas G, sino a que las proteínas G implicadas tienen efectos opuestos: por un lado, la proteína G_s acoplada al receptor 5-HT₇ produce un aumento del AMPc, sin embargo, la proteína G_i acoplada al receptor D₂ promueve su disminución. Al tratarse de efectos opuestos, los agonistas del receptor D₂ disminuyen el AMPc a través de la proteína G_i a la que está acoplada este receptor. Por ello, también, cuando bloqueamos el receptor D₂ con sus antagonistas, no se produce ningún efecto sobre la respuesta de la serotonina, ya que los antagonistas no modifican los niveles de AMPc. Todo ello parece descartar una señalización oligomérica indicando un clásico cruce de señales intracelulares opuestas mediadas por los dos receptores de membrana de forma independiente.

A continuación, se estudió la interacción física de estos receptores, para comprobar la formación de complejos en la membrana celular. Con el fin de evaluar la posible formación de un heterodímero entre los receptores D₂ y 5-HT₇, se llevaron a cabo ensayos de coimmunoprecipitación de ambos GPCRs. Tradicionalmente, las técnicas de coimmunoprecipitación han sido de referencia para detectar si dos proteínas interactúan entre sí. Aunque actualmente hay técnicas basadas en métodos biofísicos como luminiscencia o fluorescencia, las técnicas de biología molecular siguen siendo eficaces para detectar la interacción entre proteínas (Bourque *et al.*, 2020). En este caso se emplearon dos anticuerpos, un anticuerpo anti-5HT₇ que reconoce directamente el receptor 5-HT₇ y un anticuerpo anti-FLAG, que reconoce el epítipo FLAG expresado junto al receptor D₂ en nuestra línea celular. Se confirmó que ambos anticuerpos reconocían su diana de interés ya que se observaron bandas a la altura correspondiente según la bibliografía y estas bandas aumentaban la intensidad proporcionalmente al aumento de la cantidad de proteína estudiada. El peso molecular del receptor 5-HT₇ es de unos 50 kDa como describe la bibliografía (*Recombinant Anti-5HT7 Receptor antibody [EPR6271] (ab128892) |*

Abcam; Svejda *et al.*, 2013). En el caso del receptor D_2 , reconocido por el anticuerpo anti-FLAG, se observó una banda de un peso molecular de unos 70 kDa que aumentaba de intensidad a medida que la cantidad de proteína de estudio era mayor. El receptor de dopamina D_2 tiene un peso molecular alrededor de los 50 kDa como ocurre con la mayoría de los GPCRs de esta subfamilia (Yuan *et al.*, 2020), sin embargo, el hecho de que este receptor se encuentre unido al epítipo FLAG y a la proteína fluorescente amarilla (*Yellow Fluorescence Protein*, YFP) hace que su peso molecular aumente y la banda se aproxime más a los 70 kDa.

Una vez comprobada la eficacia de los anticuerpos, se llevó a cabo la coimmunoprecipitación de ambos receptores, observándose que no se produce una inmunoprecipitación conjunta. Por tanto, se corroboró que ambos receptores no están formando un heterodímero. En base a estos resultados se descartó una interacción tanto funcional como física entre ambos receptores lo que nos permitió desarrollar el estudio del heterodímero $D_2/5\text{-HT}_{2A}$ de manera adecuada.

En base a estos antecedentes, para el estudio del heterodímero $D_2/5\text{-HT}_{2A}$ se realizaron ensayos de medida de la acumulación de AMPc y se emplearon distintos agonistas y antagonistas de estos receptores, así como inhibidores de diferentes proteínas de la cascada intracelular asociada a los mismo. Se consideró necesario bloquear el receptor 5-HT_7 con su antagonista específico SB269970 para los estudios funcionales en el estudio del heterodímero $D_2/5\text{-HT}_{2A}$, ya que algunos de los agonistas del receptor 5-HT_{2A} utilizados podrían tener cierta afinidad por el receptor 5-HT_7 y podrían modificar los resultados obtenidos con respecto al heterodímero $D_2/5\text{-HT}_{2A}$.

Como se ha mencionado en la introducción, los receptores D_2 y 5-HT_{2A} forman complejos heterodiméricos en la membrana celular. La señalización intracelular del receptor 5-HT_{2A} está ligada a la proteína G_q que activa la producción de inositol fosfato y la movilización de calcio; mientras que el receptor D_2 se acopla a la proteína G_i inhibiendo la producción de AMPc. Los diversos estudios funcionales llevados a cabo con el heterodímero $D_2/5\text{-HT}_{2A}$ han demostrado una señalización cruzada a nivel intracelular entre estos receptores (Albizu *et al.*, 2011; Łukasiewicz *et al.*, 2011; Fuxe *et al.*, 2014). Además, en trabajos anteriores realizados en nuestro grupo de

investigación se observó una modulación funcional mediada por el agonista del receptor 5-HT_{2A} alucinógeno (\pm) DOI sobre la señalización de la dopamina a través del receptor D₂ (Gómez, 2017).

Medir la acumulación de AMPc asociada a la estimulación del receptor D₂ es difícil debido a la baja actividad basal de la AC y los bajos niveles basales de AMPc. Por ello es necesario el empleo de estimuladores de la AC como la forskolina que aumentan el AMPc celular, permitiendo observar el efecto de los agonistas de receptores acoplados a G_i. La **forskolina** es un diterpeno extraído de la raíz de *Plectranthus barbatus* que tiene una EC₅₀ de entre 5-10 μ M para estimular la AC (Seamon, Padgett and Daly, 1981), así se empleó a una concentración de 10 μ M en todos los ensayos realizados.

Se comprobó, en primer lugar, el efecto de los agonistas del receptor 5-HT_{2A} y su capacidad de movilizar AMPc en presencia o ausencia de forskolina. Algunos autores han descrito que este compuesto aparte de activar la AC también puede modular de alguna manera la proteína G_s (Wong and Martin, 1983), por lo que se estudió la implicación de la forskolina en la respuesta de los agonistas de 5-HT_{2A} en células que expresan el heterodímero D₂/5-HT_{2A} o cada uno de los receptores de manera individual.

Se observó que la serotonina, agonista endógeno del receptor 5-HT_{2A}, no tiene capacidad de movilizar AMPc en ausencia ni en presencia de forskolina en las células que expresan los receptores de manera individual. Esta falta de efecto confirmó un bloqueo completo del receptor 5-HT₇ por su antagonista SB269970. Sin embargo, en las células que expresan el heterodímero se observó la movilización de AMPc de manera concentración dependiente en presencia de forskolina. Este efecto es mediado a través del receptor 5-HT_{2A} ya que, al tratar las células con un antagonista específico del mismo, la ketanserina, se revirtió el efecto de la serotonina. Con el fin de descartar por completo que la serotonina pudiera desplazar la unión del antagonista SB269970 y, por tanto, aumentar el AMPc en las células que expresan el heterodímero, y asegurar que el efecto se producía a través del receptor 5-HT_{2A}, se llevaron a cabo ensayos análogos utilizando un agonista más selectivo de este receptor como es el compuesto alucinógeno (\pm) DOI.

Los resultados obtenidos demostraron que, en presencia de forskolina y cuando las células expresan el heterodímero, el (\pm) DOI moviliza AMPc de manera concentración dependiente al igual que ocurría con la serotonina. El efecto de los agonistas 5-HT_{2A} en presencia de forskolina podría deberse a un posible *crossstalk* a nivel intracelular entre los receptores D₂ y 5-HT_{2A}, que promueva la señalización a través de AMPc por la estimulación del receptor 5-HT_{2A}. Se han descrito efectos similares al observado en el presente trabajo, en los que la forskolina puede actuar de manera diferencial en la activación de AC o proteína G_s dependiendo de la presencia o no de otros compuestos (Osborne, 1990). Por otro lado, en otros estudios se han descrito distintos patrones de señalización entre los agonistas alucinógenos, como (\pm) DOI, y los no alucinógenos del receptor 5-HT_{2A}, señalando la posibilidad de que este receptor pueda acoplarse a más de una proteína G, en este caso la proteína G_i, y promoviendo un agonismo sesgado hacia la vía de señalización a través de G_i por parte de los agonistas alucinógenos (González-Maeso *et al.*, 2007; García-Bea *et al.*, 2019). En nuestros resultados, no se observó diferencia entre los agonistas, serotonina y (\pm) DOI, lo que sugiere que esta movilización de AMPc en presencia de forskolina es debida a la expresión del heterodímero y no se trata de un fenómeno de selectividad funcional. Esta hipótesis podría explicar el efecto descrito por González-Maeso y colaboradores en 2007 y que la señalización a través de G_i no se deba a la capacidad del receptor 5-HT_{2A} de acoplarse a esta proteína, sino a la heterodimerización de este receptor con otro GPCR dependiente de esa proteína, como puede ser el caso del receptor D₂ de dopamina o el mGlu2 de glutamato.

Con el fin de evaluar una posible interacción de la forskolina en la vía de señalización canónica del receptor 5-HT_{2A} que condicionase el estudio de la señalización del heterodímero D₂/5-HT_{2A}, se estudió también la implicación de este compuesto en la producción de especies de IP estimuladas por agonistas del receptor 5-HT_{2A}. Se comprobó que la forskolina no afecta a la producción de IPs estimulada por serotonina o (\pm) DOI en nuestro sistema en contra de lo que se describe en la bibliografía, donde algunos autores describen que el tratamiento con forskolina tiene un efecto negativo sobre la PLC y conlleva una disminución de la formación de IPs (Liu and Simon, 1996b; Dodge and Sanborn, 1998).

El conjunto de estos resultados y estudios previos de nuestro grupo de investigación, en los que se describe una modulación del efecto de la dopamina en presencia del agonista alucinógeno 5-HT_{2A}, (±) DOI en células que expresaban ambos receptores (Gómez, 2017), enfocaron este trabajo hacia el estudio detallado del cruzamiento de la señal que se produce entre ambos receptores para conocer a qué nivel de la cascada de señalización se produce el acoplamiento de una vía con la otra. Para ello se emplearon inhibidores específicos de distintas proteínas a distintos niveles de la cascada de señalización intracelular de ambos receptores.

El *crossstalk* entre diferentes GPCRs ha sido descrito por diversos autores y numerosos estudios han demostrado que la interacción entre proteínas G explica el cruce de señales entre diferentes receptores de membrana, siendo común la interacción entre las proteínas G_i y G_q (Ciruela *et al.*, 2001; Rives, Vol, Fukazawa, Tinel, Trinquet, Ayoub, Shigemoto, Pin and Pré Zeau, 2009). El *crossstalk* o señalización cruzada puede ser dependiente de la oligomerización de los propios GPCRs, como es el caso de la interacción descrita entre los receptores mGlu1a de glutamato y A₁ de adenosina (Ciruela *et al.*, 2001); o independiente de la interacción física, directamente a nivel de proteínas G, como ocurre con los receptores GABA_B y mGlu1a (Rives, Vol, Fukazawa, Tinel, Trinquet, Ayoub, Shigemoto, Pin and Prézeau, 2009). Por ello, nos centramos principalmente en el estudio intracelular del *crossstalk* entre los receptores D₂ y 5-HT_{2A} por la interacción entre las proteínas G a las que se acoplan estos receptores.

Para ello, se empleó la **toxina pertussis (PTX)**, que como se ha comentado anteriormente, es un inhibidor selectivo de la proteína G_i, con el fin de comprobar si el efecto modulador de (±) DOI sobre la señalización intracelular de la dopamina a través del receptor D₂ era dependiente de la **proteína G_i**. Se seleccionó una concentración de uso de 0.05 µg/ml, similar a la IC₈₀ del compuesto como se describe en la bibliografía (Katada, 2012), y un tiempo de incubación de dos horas previas al desarrollo del ensayo. La PTX inhibió el efecto de la dopamina, impidiendo la disminución de los niveles totales de AMPc estimulados por forskolina, pero no revertió el efecto de modulador de (±) DOI, lo que demuestra que el *crossstalk* que se produce entre los dos protómeros del heterodímero D₂/5-HT_{2A} es independiente de la proteína G_i.

Para estudiar la independencia de la proteína G_q , se empleó el **compuesto YM-254890**, un producto natural que se aisló del caldo de fermentación de la bacteria *Chromobacterium* sp. QS3666 en un cribado en busca de inhibidores de la agregación plaquetaria (Taniguchi *et al.*, 2003). Se trata de un depsipéptido cíclico que se ha identificado como un potente inhibidor específico de la **proteína G_q** , inhibiendo la señalización intracelular con una alta potencia de IC_{50} de 30 nM (Takasaki *et al.*, 2004). La unión de este inhibidor en el hueco hidrofóbico entre dos dominios de la proteína G_q , estabiliza la proteína en su forma inactiva unida a GDP, impidiendo el intercambio de GDP/GTP y por tanto inhibiendo la señalización intracelular (Nishimura *et al.*, 2010). Se trataron las células de estudio HEK293 Flp-In $D_2/5-HT_{2A}$ con distintas concentraciones del inhibidor a distintos tiempos y se midió la acumulación de IPs, observándose una IC_{50} similar a la descrita en la bibliografía (30 nM) (Takasaki *et al.*, 2004), por lo que se seleccionó una concentración de 50 nM próxima a la IC_{80} y 15 minutos de incubación del inhibidor para el estudio de *crosstalk* intracelular mediado por (\pm) DOI.

Se comprobó que YM-254890 inhibía por completo la producción de IPs estimulada por (\pm) DOI en el receptor $5-HT_{2A}$, al igual que está descrito para los niveles de calcio dependientes de G_q (Takasaki *et al.*, 2004). Al estudiar la señalización cruzada en presencia de YM-254890, se observó una reversión significativa del efecto modulador de (\pm) DOI sobre la respuesta de la dopamina. El tratamiento con el inhibidor demostró que el *crosstalk* que existe entre la vía de señalización del receptor $5-HT_{2A}$ estimulado por (\pm) DOI y la vía de señalización del receptor D_2 estimulado por su agonista endógeno dopamina, en la acumulación de AMPc, es dependiente de la proteína G_q .

La proteína $G_{\alpha q}$ activa directamente la **fosfolipasa C**, enzima responsable de la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) de la membrana plasmática generando como segundos mensajeros el inositol trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG) (Streb *et al.*, 1983). Existen trece PLC divididas en seis subfamilias (β , γ , δ , ϵ , η y ζ) (Suh *et al.*, 1988) siendo la subfamilia PLC β la que se activa a través de GPCRs y proteína $G_{\alpha q}$, y algunos subtipos de esta también pueden activarse por la subunidad $G_{\beta\gamma}$ de la proteína $G_{\alpha i}$ (Runnels and Scarlata, 1999). Los subtipos de esta familia se

expresan en hígado, cerebro y glándula parótida y, en concreto, la PLC β 1 en el corte cerebral e hipocampo, por lo que se ha asociado una desregulación de esta proteína con desórdenes mentales como esquizofrenia, epilepsia, depresión, bipolaridad, enfermedad de Alzheimer o Huntington (Fukaya *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2016).

Para el estudio de la implicación de esta enzima en la señalización cruzada del heterodímero D₂/5-HT_{2A} se empleó el **compuesto 48/80**, un producto condensado de la mezcla de N-metil-p-metoxifenetilamina y formaldehído. Inicialmente empleado como un liberador de histamina e inhibidor de calmodulina, presenta, además, un potente efecto inhibidor de PLC (Bronner *et al.*, 1987). Se trataron las células con el inhibidor a distintos tiempos y concentraciones y se seleccionó un tiempo de incubación de 15 minutos y una concentración de 30 μ M correspondiente a su IC₈₀. Al igual que ocurre con el inhibidor de G_q, se comprobó que, al inhibir la PLC con este compuesto, se inhibía la señalización a través de IPs por parte del agonista (\pm) DOI actuando sobre el receptor 5-HT_{2A}. El efecto modulador de (\pm) DOI sobre la respuesta de la dopamina se revirtió de manera estadísticamente significativa con el tratamiento con el inhibidor de PLC, demostrando que el *crossstalk* que se produce entre ambos receptores, D₂ y 5-HT_{2A}, es dependiente de PLC.

Una vez comprobado que la PLC era necesaria para observar el efecto modulador de (\pm) DOI sobre la respuesta de dopamina en el receptor D₂, se estudió la implicación del calcio en esta vía de señalización cruzada. La activación de PLC lleva a la formación IP₃ que se une a receptores específicos dando lugar a la movilización de **calcio intracelular** de depósitos del retículo endoplasmático, se comprobó si este segundo mensajero estaba implicado en el *crossstalk* funcional de los receptores de estudio. El ácido 1,2 bis (2-animofenoxi) etano-N,N,N',N' tetraacético (**BAPTA**) es un quelante permeable a la membrana celular con alta afinidad por iones de calcio. Es capaz de incorporar dos iones de calcio gracias a sus cuatro grupos funcionales de ácido carboxílico, de manera que se controlan los niveles de calcio a nivel intracelular (Britigan, Rasmussen and Cox, 1998).

El tratamiento de las células durante 1 hora a una concentración de 1 mM de BAPTA, quela el calcio del medio y el calcio intracelular disminuyendo la acumulación de este ion como se describe en la bibliografía

(Srivats *et al.*, 2016). Se comprobó que la inhibición de calcio disminuye los niveles de AMPc, lo que puede ser debido a que algunos subtipos de adenilato ciclasas son dependientes de calcio (Bosse *et al.*, 2019; Tanzarella *et al.*, 2019). Sin embargo, el efecto modulador de (\pm) DOI sobre la respuesta de dopamina en la acumulación de AMPc no varió en presencia del quelante de calcio BAPTA, lo que sugiere que este efecto es independiente de calcio.

Por otro lado, empleamos la **tapsigargina**, que es un inhibidor de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoendoplásmico (SERCA). Este compuesto se aisló inicialmente de las raíces de la planta *Thapsia garganica* como irritante cutáneo (Quynh Doan and Christensen, 2015; Thi *et al.*, 2015). Se empleó la tapsigargina en este trabajo con el fin de bloquear los depósitos de calcio por completo para observar si la modulación de (\pm) DOI era dependiente de calcio. Al inhibir los SERCA, se impide el flujo de Ca^{2+} al interior del retículo, aumentando los niveles citosólicos. Además, este bloqueo de la bomba potencia el flujo de iones de Ca^{2+} del retículo al citosol y promueve la estimulación de receptores y canales de la membrana celular, como los SOCE (entrada de calcio operada por depósitos) que provocan la entrada de más calcio al interior para intentar compensar la ausencia de calcio en el retículo (Quynh Doan and Christensen, 2015).

Se puso a punto las condiciones de tratamiento con tapsigargina tanto en presencia como en ausencia de BAPTA. Observamos que el calcio intracelular aumentaba a medida que se aumentaba la concentración de tapsigargina ya que esta inhibe el flujo hacia el interior de retículo endoplasmático. Este efecto se inhibió en presencia de BAPTA disminuyendo los niveles de calcio hasta niveles basales, confirmando que la combinación de ambos inhibidores bloquea el efecto intracelular del calcio. Sin embargo, hubo diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con tapsigargina 10 μM y el control basal en presencia de BAPTA 1 mM, lo que podía ser debido a la activación de los canales SOCE que promueven la entrada de calcio del exterior. Por ello, se comprobó el efecto de la tapsigargina en ausencia o presencia de BAPTA a una concentración de 10 μM y 1 μM (en la cual se inhibió por completo la movilización de calcio llegando a niveles basales) durante 10 minutos (Miyakawa *et al.*, 2013), sobre el *crossstalk* intracelular entre (\pm) DOI y

dopamina. En ninguna de las situaciones estudiadas se revirtió el efecto de (\pm) DOI de manera estadísticamente significativa comprobando la independencia del efecto de calcio en la señalización cruzada entre ambos receptores. En contra de lo que describen algunos autores, en el caso del heterodímero $D_2/5\text{-HT}_{2A}$, el flujo de calcio estimulado por el agonista (\pm) DOI no modula la actividad de la adenilato ciclasa estimulando la producción de AMPc (Abrams, Karl and Kandel, 1991; Kuo *et al.*, 2014).

Siguiendo con el estudio de la vía de señalización G_q/PLC se evaluó el efecto de la **proteína quinasa C** sobre el *crossstalk* entre los receptores. La activación de la PLC promueve la formación de DAG que estimula la PKC. Además, diversos tipos de PKC son dependientes de calcio, por lo que esta proteína se activa por diferentes vías dentro de la señalización acoplada a proteínas G_q . Además, está descrito que otras proteínas quinasas, como la PKA, implicada en la vía de señalización de AMPc, tienen efecto sobre la fosfolipasa C (Guo *et al.*, 2017), con lo cual se comprobó cómo afectaba la inhibición de la PKC al efecto modulador de (\pm) DOI. La PKC pertenece a una familia de diez quinasas de serina/treonina que se dividen en tres subtipos según sus ligandos y cofactores a los que se unen (Newton, 2001). Esta proteína es el sustrato principal del DAG que se forma tras la activación de PLC y necesita para activarse la presencia de calcio como cofactor (Yamamoto *et al.*, 1978).

El inhibidor específico de PKC permeable a la membrana celular, **R032-0432**, es un derivado de la estaurosporina que compite por el sitio de unión del ATP en la quinasa (Sobhia *et al.*, 2013). Se ha descrito que este inhibidor tiene una potencia 10 veces mayor por $PKC\alpha$ ($IC_{50} = 9$ nM) y 4 veces mayor por $PKC\beta I$ ($IC_{50} = 28$ nM) que por $PKC\epsilon$ ($IC_{50} = 108$ nM) (Wilkinson, Parker and Nixon, 1993). Para los ensayos realizados con este inhibidor se utilizó una concentración de 10 μM y se trataron las células durante 24 horas según lo descrito en la bibliografía (Matsumoto *et al.*, 2013).

Antes de evaluar el efecto de esta quinasa en la señalización cruzada entre los receptores D_2 y 5-HT_{2A} , se comprobó si el tratamiento con el inhibidor modulaba los niveles de IPs y AMPc, ya que, como ocurre con otras proteínas quinasas, estas pueden tener un efecto inhibitor o estimulador sobre la PLC o la AC así como otras proteínas de la cascada intracelular (Liu and Simon, 1996a; Sadana and Dessauer, 2009). Se observó que la

capacidad del (\pm) DOI para producir especies de IPs disminuyó en presencia del inhibidor de PKC. Se ha descrito que la PKC puede controlar los niveles de IPs mediante la regulación de la PLC, así como pueden tener un efecto de *feedback* negativo sobre receptores que llevan a una disminución de los niveles de IPs (Barnes and Conn, 1993; Prestwich and Bolton, 1995; Chen and Lin, 1999). Sin embargo, la inhibición con R032-0432 no alteró los niveles de AMPc en ausencia o en presencia del de forskolina o (\pm) DOI, de manera que se descartó que este inhibidor modificara los niveles totales de AMPc siendo una herramienta adecuada para el estudio del *crosstalk* del heterodímero.

Los ensayos de acumulación de AMPc en presencia del inhibidor confirmaron que la modulación del efecto de la dopamina sobre el receptor D_2 mediado por (\pm) DOI son independientes de la PKC, ya que la inhibición de esta proteína no revirtió el efecto potenciador del agonista alucinógeno.

Por tanto, en la vía de señalización dependiente de proteína G_q , se comprobó que el efecto modulador de (\pm) DOI era dependiente de la proteína G_q y la PLC, pero independiente del calcio. Además, tampoco dependía de PKC, por lo que la señalización cruzada de estas dos vías es independiente de DAG.

Basándonos en estudios en los que se describe una señalización cruzada entre las vías dependientes de AC/PKA y PLC/PKC (Guo *et al.*, 2017). Por un lado, existe una relación directa entre la PKA y la PLC, de manera que la activación de PKA por activadores de la AC como la forskolina, provocan una inhibición de la PLC (Liu and Simon, 1996a). Por otro lado, también se ha descrito una implicación de los niveles aumentados de calcio en el aumento de AMPc y la consecuente activación de la PKA (Abrams, Karl and Kandel, 1991; Kuo *et al.*, 2014). Por todo ello, se decidió estudiar la implicación de la PKA en la señalización cruzada de los receptores del heterodímero $D_2/5-HT_{2A}$.

La **proteína quinasa A** es una holoenzima que consiste en un heterotetrámero compuesto por dos homodímeros, dos subunidades catalíticas que están unidas a dos subunidades reguladoras. Múltiples genes se han descrito para ambas subunidades: tres genes dan lugar a la subunidad catalítica ($C\alpha$, $C\beta$ y $C\gamma$) con distintas isoformas de cada tipo; y

cuatro a la subunidad reguladora (RI α , RI β , RII α y RII β) (Skalhegg, 2000). Cuando se produce el aumento de AMPc gracias a un equilibrio entre la acción de las adenilato ciclasas y las fosfodiesterasas (PDE) que hidrolizan AMPc, se activa la PKA entre otros efectores. Cuatro moléculas de AMPc se unen a las regiones reguladoras de la PKA, dos a cada subunidad del dímero. Esto provoca un cambio conformacional en la subunidad reguladora que pierde afinidad por la subunidad catalítica dando lugar a la disociación de las subunidades catalíticas activas que fosforilan residuos de serina y treonina de sustratos específicos (**Figura 65**) (Torres-Quesada, Mayrhofer and Stefan, 2017).

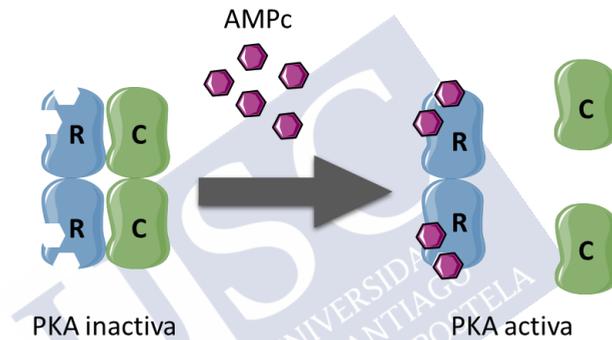


Figura 65. Activación de la proteína quinasa A. R: subunidad reguladora, C: subunidad catalítica. Imagen realizada por la doctoranda.

Para estudiar el efecto de esta proteína sobre la señalización cruzada de ambos receptores del heterodímero se empleó un inhibidor específico, **PKI (14-22)-amida**. Se trata de un péptido sintético cuya estructura se corresponde con la secuencia aminoacídica de la porción activa del inhibidor endógeno termoestable de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKI) (Scott *et al.*, 1985). Es un inhibidor potente y competitivo por sustratos específicos de PKA, que se une e inactiva la subunidad catalítica. El tamaño reducido de este péptido y su extremo amino miristoilado le permiten atravesar la membrana lipídica y exhibe una potencia inhibitoria con valores de $K_i = 36$ nM (Dalton *et al.*, 2005).

Según lo descrito en la bibliografía se empleó el inhibidor a una concentración de 40 μ M y se pretrataron las células durante tres horas (Cheng *et al.*, 2017). Algunos autores describen una relación entre el

aumento de la producción de AMPc y, por tanto una estimulación de la PKA, con la inhibición de la PLC y la disminución de los niveles totales de IPs (Liu and Simon, 1996b; Dodge and Sanborn, 1998). Con el fin de comprobar si el tratamiento con el inhibidor de PKA interfería en la vía de señalización del receptor 5-HT_{2A} a través de G_q y la acumulación de especies de IPs, se realizaron curvas concentración-respuesta del agonista (±) DOI en presencia de PKI 14-22, comprobándose que no modificaba los niveles de especies de IPs. También se evaluó si el inhibidor PKI 14-22 era capaz de modificar directamente los niveles de acumulación de AMPc o de IPs de manera concentración dependiente, confirmando que este inhibidor no afecta a los niveles totales de ambos segundos mensajeros.

El estudio de la señalización cruzada entre ambos receptores del heterodímero D₂/5-HT_{2A} demostró que en presencia del inhibidor de PKA, PKI 14-22 a una concentración de 40 μM, se revertía el efecto potenciador del agonista (±) DOI sobre la respuesta de la dopamina de manera estadísticamente significativa.

Los resultados obtenidos confirman que la modulación del efecto de la dopamina al estimular el receptor D₂ con el (±) DOI, agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A}, está mediada por la vía de señalización G_q/PLC/PKA. Numerosas publicaciones científicas describen un *crossstalk* entre el calcio y el AMPc a varios niveles de la cascada de señalización, de manera que el calcio puede actuar sobre AC, PDE y PKA, entre otras proteínas (Gorbunova and Spitzer, 2002; Clapham, 2007; Ni *et al.*, 2011; Ahuja *et al.*, 2014). Sin embargo, en este trabajo se ha identificado una señalización cruzada entre las vías acopladas a G_q y G_i, independiente de Ca²⁺ y en la que está involucrada la PKA, pero no otras proteínas quinasas como la PKC.

Con el fin de confirmar el efecto de esta proteína quinasa y su implicación en el *crossstalk* entre los receptores del heterodímero D₂/5-HT_{2A} se evaluó la activación de esta proteína mediante el uso de lisados celulares estimulados de igual forma que en los ensayos funcionales. Los ensayos de medida de la actividad de PKA se basaron en técnicas inmunológicas de reconocimiento de un sustrato específico de esta proteína por anticuerpos frente al mismo. Se demostró que, en presencia del agonista alucinógeno (±) DOI, la actividad de PKA aumentó un 20% con respecto a la PKA en presencia exclusivamente de dopamina. Este aumento sugiere que el efecto

modulador de (\pm) DOI sobre la respuesta de dopamina través del receptor D_2 es mediado por un aumento de la actividad de PKA.

En los ensayos realizados para comprobar de manera directa la fosforilación y, por tanto, la activación de la PKA se emplearon anticuerpos específicos frente a la subunidad reguladora del tetrámero. La subunidad reguladora RII es la isoforma predominante y principal mediador de la actividad de AMPc en el sistema nervioso central (Skalhegg and Tasken, 2000). Se seleccionó un anticuerpo específico para una región no comprometida con la unión a AMPc de la subunidad reguladora RII con el fin de medir la PKA total; y un anticuerpo específico para una región fosforilada de la subunidad RII (*phospho* S99) indicativo de su activación tras la unión a AMPc. Las células se estimularon según las diferentes condiciones a estudiar según se describe en la bibliografía y en los ensayos funcionales de la medida de acumulación de AMPc y se empleó una cantidad de proteína de 20 μ g para la detección por *western blot* de la PKA total y fosforilada como describen otros autores (Dwivedi, Rizavi and Pandey, 2002; García-Morales, Luaces-Regueira and Campos-Toimil, 2017; Isensee *et al.*, 2018).

Las bandas reveladas corresponden con la subunidad reguladora RII de la PKA total o fosforilada y tienen un peso molecular de 50 kDa como está descrito en la bibliografía (Manni *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en la densitometría de las bandas mostraron que el efecto modulador del alucinógeno (\pm) DOI sobre el efecto de la dopamina en el receptor D_2 conlleva un aumento de la PKA fosforilada con respecto a la total, y en presencia del inhibidor específico de PKA, PKI 14-22 este efecto se revierte y disminuye la cantidad de PKA fosforilada con respecto a la total de manera estadísticamente significativa. Esto se relaciona con los resultados obtenidos anteriormente en los ensayos funcionales.

El efecto cruzado del agonista de 5-HT_{2A} (\pm) DOI, potenciando la actividad de PKA, es una revelación crítica que puede explicar el funcionamiento diferencial de los antipsicóticos típicos y atípicos. Varios estudios han sugerido que los antipsicóticos modulan diferencialmente la vía de señalización AC/AMPc a niveles anteriores en la cascada, al igual que la expresión de algunas de las proteínas implicadas en estas vías (Gupta and Mishra, 1992; Shin *et al.*, 1995; Kaplan, Leite-Morris and J. Keith, 1999). Sin

embargo, Dwivedi y colaboradores han descrito que el tratamiento crónico con haloperidol y clozapina regula de manera diferencial la vía de señalización dependiente de AC y AMPc a nivel de la PKA (Dwivedi, Rizavi and Pandey, 2002). El tratamiento prolongado con haloperidol promueve un aumento de la actividad de PKA dependiente de AMPc y de la unión de [^3H]AMPc a las subunidades reguladoras de la PKA en el estriado, pero no en el córtex cerebral; mientras que el tratamiento con clozapina disminuye la expresión de las subunidades de la PKA. Los mecanismos por los que la PKA está involucrada en esta regulación diferencial por parte de los antipsicóticos no están descritos, pero podrían explicarse con lo observado en este trabajo por medio del heterodímero $D_2/5\text{-HT}_{2A}$. El efecto potenciador del agonista alucinógeno (\pm) DOI de la actividad de la PKA a través del receptor 5-HT_{2A} podría estar ligado a la disminución de la expresión de la PKA que observan Dwivedi y colaboradores cuando se produce un tratamiento prolongado con el antagonista, clozapina, que es un antipsicótico atípico que tiene mayor afinidad por 5-HT_{2A} que por D_2 . Del mismo modo, el aumento de la actividad de PKA y la unión de [^3H]AMPc a las subunidades reguladoras en la zona del estriado debido al tratamiento prolongado con haloperidol, podría estar relacionado con su efecto sobre el heterodímero, que, está localizado en esta zona cerebral (Borroto-Escuela *et al.*, 2013).

Muchas funciones biológicas están reguladas por el estado de fosforilación de diferentes proteínas específicas. La PKA es una enzima reguladora importante que fosforila varios sustratos entre los que se incluyen factores de transcripción involucrados en la síntesis y liberación de neurotransmisores, desensibilización e inactivación de receptores y mantenimiento neuronal (Skroblin *et al.*, 2010). Por ello, se decidió estudiar la activación de esta proteína midiendo de manera indirecta la fosforilación de un sustrato específico como es la **proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB)**. Esta proteína se localiza en el núcleo de todos los tipos celulares y actúa como un factor de transcripción que controla la activación de más de 4000 genes según un cribado del genoma de los sitios de unión de CREB (Zhang *et al.*, 2005). La vía canónica de activación de esta proteína se produce a través de un aumento de AMPc y posterior activación de la PKA, que fosforila la CREB en la serina 133, residuo necesario para activar la transcripción de genes (Gonzalez and Montminy, 1989; Herold *et*

al., 2011). Esta proteína también puede ser fosforilada por otras quinasas como la proteína quinasa dependiente de calmodulina (CaMK), la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), la quinasa Akt o la proteína quinasa regulada por señal extracelular 1 o 2 (ERK1/2), entre otras (Brami-Cherrier *et al.*, 2002; Alberini, 2009; Grimes *et al.*, 2015).

Mediante el uso de la tecnología Alpha[®], la cual amplifica la señal y la hace fácilmente detectable por un lector de luminiscencia, se midió la proteína CREB total. Se observó que la CREB total variaba en presencia del inhibidor específico de PKA, PKI 14-22 a una concentración de 40 μ M. Se ha descrito en la bibliografía cómo la actividad y cantidad de CREB en el núcleo puede ser aumentada por altos niveles de glucosa (Habib *et al.*, 2015); y también, cómo el tratamiento con olanzapina (antipsicótico atípico) aumenta los niveles de esta proteína en la corteza prefrontal, hipocampo y estriado de ratas adultas de Wistar (Réus *et al.*, 2012). Según los resultados obtenidos en este trabajo, el tratamiento con el inhibidor PKI 14-22 está influyendo también en la cantidad total de CREB, por lo que esta medida de CREB total no se tuvo en cuenta para realizar una medida cuantitativa de la activación de CREB, sino que se midió la fosforilación de CREB de una manera cualitativa.

El método que empleamos para medir la fosforilación de CREB detectó la fosforilación en el residuo de serina 133 de CREB, que es la principal diana de la PKA. La proteína CREB fosforilada varió en presencia del alucinógeno (\pm) DOI y con el tratamiento del inhibidor PKI 14-22. El aumento de la actividad de PKA observado en los estudios anteriores en presencia de (\pm) DOI se corroboró también con la medida de la fosforilación de CREB, que aumentó en presencia de este agonista. Este aumento parece ser debido a la actividad aumentada de la PKA, que es la ruta canónica de activación de CREB en la serina 133, y que en este trabajo se ha comprobado que está potenciada por (\pm) DOI. Si bien es cierto que no podemos descartar que también puede deberse a una activación a través de la movilización de calcio estimulada por la vía de señalización G_q /PLC dependiente del receptor 5-HT_{2A}, que lleva a la activación de otras quinasas, como la CaMK, que también fosforila la proteína CREB en la serina 133.

Por otro lado, el tratamiento del inhibidor PKI 14-22 revirtió el efecto potenciador de (\pm) DOI, provocando una disminución estadísticamente

significativa de la proteína CREB fosforilada. Por lo que se demostró que la activación de CREB se producía a través de la PKA y, además, que ambas proteínas juegan un papel fundamental en el *crossstalk* que se produce entre los receptores del heterodímero D₂/5-HT_{2A}.

Varios estudios anteriores han sugerido la implicación de la expresión y actividad de CREB, regulada por la vía de AMPc/PKA, en la patología de la esquizofrenia y por tanto su relevancia como dianas en el tratamiento con antipsicóticos. En modelos animales de esquizofrenia, se ha observado que la actividad de PKA y CREB está disminuida y el tratamiento con antipsicóticos aumenta la actividad de CREB en regiones del estriado, recuperando el fallo sensomotor característico de la esquizofrenia (Culm *et al.*, 2004). La activación de CREB regula la transcripción de varios genes entre los que se encuentran los de la tirosina hidroxilasa y los de los receptores de serotonina 2A, entre otros. Además, estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han permitido relacionar algunos genes implicados en la vía de señalización AMPc/PKA/CREB con la esquizofrenia, como por ejemplo genes relacionados con las sinapsis (CREB1, CREM, PPP3CB y PPKAR1A) (Forero *et al.*, 2016). Asimismo, como ocurría con la PKA, los antipsicóticos también modulan la fosforilación y, por tanto, activación de CREB de manera diferencial. El haloperidol estimula la fosforilación de CREB en neuronas del estriado, mientras que la clozapina la reduce (Pozzi *et al.*, 2003b).

En el presente trabajo se ha demostrado que existe una señalización cruzada o *crossstalk* entre los receptores D₂ y 5-HT_{2A} que forman complejos heterodiméricos en la membrana celular. Además, se ha observado que la interacción entre las vías de señalización de estos receptores se produce a través de la proteína G_q/PLC y PKA/CREB (**Figura 66**). Los resultados obtenidos permiten ampliar el conocimiento de la farmacología de estos receptores implicados en enfermedades mentales como la esquizofrenia permitiendo mejorar el diseño de futuros nuevos fármacos antipsicóticos.

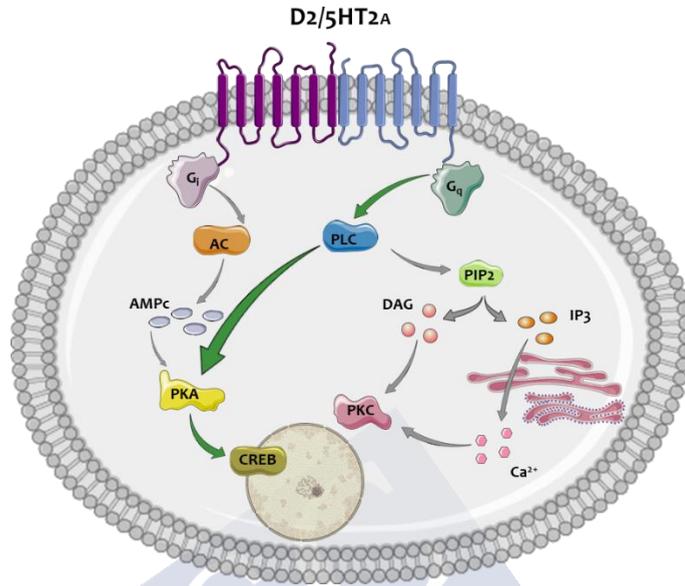


Figura 66. Esquema representativo del *crosstalk* (flechas verdes) que se produce entre las vías de señalización del heterodímero D₂/5-HT_{2A}. Imagen realizada por la doctoranda.

En resumen, los hechos descritos anteriormente por otros autores, junto los descritos en este trabajo, sugieren que el heterodímero D₂/5-HT_{2A} podría estar implicado en la modulación diferencial de la vía de señalización PKA/CREB por parte del agonista alucinógeno (\pm) DOI y de los antipsicóticos, abriendo una nueva avenida molecular en la farmacología antipsicótica y en el desarrollo de futuros fármacos que actúen en el heterodímero D₂/5-HT_{2A} como conjunto y no solo sobre los receptores monoméricos.





CONCLUSIONES

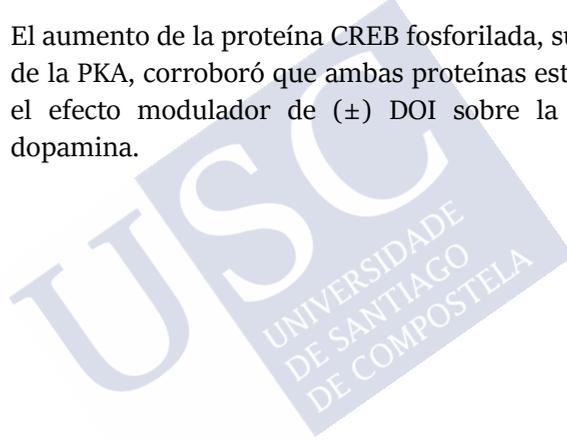


CONCLUSIONES

1. **El estudio de los receptores 5-HT₇ de serotonina y D₂ de dopamina descartó la interferencia cruzada de los ligandos del receptor D₂ en la señalización a través de AMPc del receptor 5-HT₇ y la formación de complejos oligoméricos entre estos receptores en el sistema celular empleado.**
 - 1.1 Los agonistas del receptor D₂ disminuyeron los niveles intracelulares de AMPc vía G_i, oponiéndose al aumento vía G_s del receptor 5-HT₇, pero no interfirieron en la señalización de la serotonina o el SB269970 en el receptor 5-HT₇. No existe una señalización cruzada entre estos receptores.
 - 1.2 Los ensayos de coimmunoprecipitación confirmaron que no se forman oligómeros entre el receptor D₂ y 5-HT₇ en las membranas del modelo celular HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP, empleado para el estudio.
2. **La caracterización farmacológica de la señalización intracelular cruzada del heterodímero D₂/5-HT_{2A} demostró que existe un *crossstalk* diferencial entre ambos protómeros del complejo mediado por la proteína G_q, PLC y PKA, respecto de sus entidades monoméricas.**
 - 2.1 La proteína G_i no participó en el *crossstalk* entre ambos protómeros. El empleo de la toxina *Pertussis* demostró que el efecto modulador de (±) DOI sobre la respuesta de la dopamina fue independiente de la proteína G_i.
 - 2.2 El efecto modulador de (±) DOI sobre la respuesta de la dopamina fue dependiente de G_q y PLC. El empleo del inhibidor de G_q, YM-254890 y de PLC, compuesto 48/80, revirtieron el efecto modulador de (±) DOI de manera estadísticamente significativa.
 - 2.3 El *crossstalk* fue independiente del calcio intracelular, de la proteína quinasa C y del DAG. El quelante de calcio, BAPTA, y el inhibidor de la Ca²⁺ ATPasa de retículo endoplasmático,

tapsigargina, no modificaron el efecto modulador de (\pm) DOI, al igual que el inhibidor de la PKC, Ro-320432.

- 2.4 La vía de señalización dependiente de PKA participó en el *crossstalk* entre ambos receptores. El inhibidor PKI 14-22 revertió de manera estadísticamente significativa, el efecto modulador de (\pm) DOI sobre la respuesta de la dopamina en el receptor D₂.
- 2.5 La fosforilación de la PKA aumentó de manera estadísticamente significativa en presencia de (\pm) DOI y este aumento se revirtió con el inhibidor específico, PKI 14-22.
- 2.6 El aumento de la proteína CREB fosforilada, sustrato específico de la PKA, corroboró que ambas proteínas están implicadas en el efecto modulador de (\pm) DOI sobre la respuesta de la dopamina.



CONCLUSIONS

1. **The study of serotonin 5-HT₇ receptor and dopamine D₂ receptor discarded the cross-communication of D₂ ligands in cAMP-mediated 5-HT₇ receptor signalling and the formation of oligomeric complexes between both receptors in the cellular system used.**
 - 1.1 D₂ agonists decreased intracellular cAMP levels through G_i, opposing the G_s increase of 5-HT₇, but did not interfere with serotonin or SB269970 signalling through 5-HT₇. A crosstalk between both receptors was not assessed.
 - 1.2 Co-immunoprecipitation assays confirmed the absence of D₂ and 5-HT₇ complexes formation in the membranes of the selected cellular model, HEK 293 Flp-InTM T-RexTM myc-5-HT_{2A}-CFP/ FLAG-D₂-YFP.
2. **Pharmacological characterization of D₂/5-HT_{2A} heterodimer intracellular crosstalk demonstrated the existence of a differential crosstalk between both protomers of the complex mediated by G_q protein, PLC and PKA, in respect to their monomeric entities.**
 - 2.1 G_i protein did not participate in the crosstalk between both protomers. *Pertussis* toxin showed that the modulator effect of (±) DOI in dopamine-response was independent of G_i protein.
 - 2.2 Modulator effect of (±) DOI in dopamine-response was dependent of G_q and PLC. The use of G_q inhibitor, YM254890, and PLC inhibitor, 48/80 compound, significantly reverted (±) DOI modulator effect.
 - 2.3 Crosstalk was independent of intracellular calcium, protein kinase C and DAG. Calcium chelator, BAPTA, and endoplasmatic reticulum Ca²⁺ ATPase, thapsigargin, did not modify the modulator effect of (±) DOI. Same did the PKC inhibitor, Ro-320432.

- 2.4 PKA mediated pathway participated in both receptors' crosstalk. PKI 14-22 inhibitor significantly reverted the modulator effect of (\pm) DOI in dopamine mediated- D_2 response.
- 2.5 PKA phosphorylation significantly increased in presence of (\pm) DOI and this rise was reverted by specific inhibitor PKI 14-22.
- 2.6 The increase of phosphorylated CREB, a specific PKA substrate, corroborated that both proteins are involved in the modulator effect of (\pm) DOI in dopamine-response.





REFERENCIAS



REFERENCIAS

Abrams, T. W., Karl, K. A. and Kandel, E. R. (1991) 'Biochemical studies of stimulus convergence during classical conditioning in Aplysia: Dual regulation of adenylate cyclase by Ca²⁺/calmodulin and transmitter', *Journal of Neuroscience*, 11(9), pp. 2655–2665. doi: 10.1523/jneurosci.11-09-02655.1991.

Ahuja, M. *et al.* (2014) 'cAMP and Ca²⁺ signaling in secretory epithelia: Crosstalk and synergism', *Cell Calcium*. Elsevier Ltd, pp. 385–393. doi: 10.1016/j.ceca.2014.01.006.

Alberini, C. M. (2009) 'Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity', *Physiological Reviews*. Physiol Rev, pp. 121–145. doi: 10.1152/physrev.00017.2008.

Albizu, L. *et al.* (2011) 'Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors', *Neuropharmacology*, 61(4), pp. 770–777. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.05.023.

Alexander, S. P. H. *et al.* (2019) 'THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors', *British Journal of Pharmacology*, 176(S1), pp. S21–S141. doi: 10.1111/bph.14748.

Amin, A. H., Crawford, T. B. B. and Gaddum, J. H. (1954) 'The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog', *The Journal of Physiology*, 126(3), pp. 596–618. doi: 10.1113/jphysiol.1954.sp005229.

Andersen, P. H. *et al.* (1990) 'Dopamine receptor subtypes: beyond the D₁/D₂ classification', *Trends in Pharmacological Sciences*, 11(6), pp. 231–236. doi: 10.1016/0165-6147(90)90249-8.

Anighoro, A., Bajorath, J. and Rastelli, G. (2014) 'Polypharmacology: Challenges and opportunities in drug discovery', *Journal of Medicinal Chemistry*. American Chemical Society, pp. 7874–7887. doi: 10.1021/jm5006463.

Aringhieri, S. *et al.* (2018) 'Molecular targets of atypical antipsychotics: From mechanism of action to clinical differences', *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., pp. 20–41. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.012.

Arseneault, L. *et al.* (2002) 'Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: Longitudinal prospective study', *British Medical Journal*, 325(7374), pp. 1212–1213. doi: 10.1136/bmj.325.7374.1212.

Baker, L. P. *et al.* (1998) 'Stimulation of type 1 and type 8 Ca²⁺/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the G(s)-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT(7A) receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 273(28), pp. 17469–17476. doi: 10.1074/jbc.273.28.17469.

Baldwin, J. M. (1994) 'Structure and function of receptors coupled to G proteins', *Current Opinion in Cell Biology*, 6(2), pp. 180–190. doi: 10.1016/0955-0674(94)90134-1.

Bar-Shavit, R. *et al.* (2016) 'G protein-coupled receptors in cancer', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms17081320.

Baragli, A. *et al.* (2007) 'Heterooligomerization of human dopamine receptor 2 and somatostatin receptor 2. Co-immunoprecipitation and fluorescence resonance energy transfer analysis', *Cellular Signalling*, 19(11), pp. 2304–2316. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.07.007.

Barnes, S. J. and Conn, M. M. (1993) 'Cholera toxin and dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate sensitize gonadotropin-releasing hormone-stimulated inositol phosphate production to inhibition in protein kinase-C (PKC)-depleted cells: Evidence for cross-talk between a cholera toxin-sensitive G-protein and PKC', *Endocrinology*, 133(6), pp. 2756–2760. doi: 10.1210/endo.133.6.8243300.

Beaulieu, J. M. and Gainetdinov, R. R. (2011) 'The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors', *Pharmacological Reviews*, pp. 182–217. doi: 10.1124/pr.110.002642.

Berg, K. A. *et al.* (1998) 'Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: Evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus', *Molecular Pharmacology*, 54(1), pp. 94–104. doi: 10.1124/mol.54.1.94.

Berger, M., Gray, J. A. and Roth, B. L. (2009) 'The expanded biology of serotonin', *Annual Review of Medicine*. Annu Rev Med, pp. 355–366. doi: 10.1146/annurev.med.60.042307.110802.

Bonsi, P. *et al.* (2007) 'Endogenous serotonin excites striatal cholinergic interneurons via the activation of 5-HT_{2C}, 5-HT₆, and 5-HT₇ serotonin receptors: Implications for extrapyramidal side effects of serotonin reuptake inhibitors', *Neuropsychopharmacology*, 32(8), pp. 1840–1854. doi: 10.1038/sj.npp.1301294.

Borroto-Escuela, D. O. *et al.* (2010) 'Dopamine D₂ and 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptors assemble into functionally interacting heteromers', *Biochemical*

and *Biophysical Research Communications*, 401(4), pp. 605–610. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.110.

Borroto-Escuela, D. O. *et al.* (2013) ‘G protein-coupled receptor heterodimerization in the Brain’, in *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., pp. 281–294. doi: 10.1016/B978-0-12-391862-8.00015-6.

Borroto-Escuela, D. O. *et al.* (2014) ‘Hallucinogenic 5-HT_{2A}R agonists LSD and DOI enhance dopamine D₂R protomer recognition and signaling of D₂-5-HT_{2A} heteroreceptor complexes’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(1), pp. 278–284. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.104.

Bosse, K. E. *et al.* (2019) ‘Calcium/calmodulin-stimulated adenylyl cyclases 1 and 8 regulate reward-related brain activity and ethanol consumption’, *Brain Imaging and Behavior*, 13(2), pp. 396–407. doi: 10.1007/s11682-018-9856-6.

Bourque, K. *et al.* (2020) ‘Exploring functional consequences of GPCR oligomerization requires a different lens’, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V., pp. 181–211. doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.11.001.

Bouvier, M. (2001) ‘Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors’, *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), pp. 274–286. doi: 10.1038/35067575.

Boyer, S. B. *et al.* (2009) ‘Direct interaction of GABAB receptors with M₂ muscarinic receptors enhances muscarinic signaling’, *Journal of Neuroscience*, 29(50), pp. 15796–15809. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4103-09.2009.

Brami-Cherrier, K. *et al.* (2002) ‘Dopamine induces a PI₃-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: A new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation’, *Journal of Neuroscience*, 22(20), pp. 8911–8921. doi: 10.1523/jneurosci.22-20-08911.2002.

Brea, J. *et al.* (2009) ‘Evidence for distinct antagonist-revealed functional states of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor homodimers’, *Molecular Pharmacology*, 75(6), pp. 1380–1391. doi: 10.1124/mol.108.054395.

Britigan, B. E., Rasmussen, G. T. and Cox, C. D. (1998) ‘Binding of iron and inhibition of iron-dependent oxidative cell injury by the “calcium chelator” 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane N,N,N’,N’-tetraacetic acid (BAPTA)’, *Biochemical Pharmacology*, 55(3), pp. 287–295. doi: 10.1016/S0006-2952(97)00463-2.

Bronner, C. *et al.* (1987) 'Compound 48/80 is a potent inhibitor of phospholipase C and a dual modulator of phospholipase A2 from human platelet', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 920(3), pp. 301-305. doi: 10.1016/0005-2760(87)90108-1.

Bruce, M. L., Takeuchi, D. T. and Leaf, P. J. (1991) 'Poverty and Psychiatric Status: Longitudinal Evidence From the New Haven Epidemiologic Catchment Area Study', *Archives of General Psychiatry*, 48(5), pp. 470-474. doi: 10.1001/archpsyc.1991.01810290082015.

Butini, S. *et al.* (2016) 'Polypharmacology of dopamine receptor ligands', *Progress in Neurobiology*. Elsevier Ltd, pp. 68-103. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.03.011.

Bymaster, F. P. *et al.* (2003) 'Muscarinic mechanisms of antipsychotic atypicality', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(7), pp. 1125-1143. doi: 10.1016/j.pnpbp.2003.09.008.

Canals, M. *et al.* (2003) 'Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: Qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer', *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), pp. 46741-46749. doi: 10.1074/jbc.M306451200.

Cannon, M., Jones, P. B. and Murray, R. M. (2002) 'Obstetric complications and schizophrenia: Historical and meta-analytic review', *American Journal of Psychiatry*. Am J Psychiatry, pp. 1080-1092. doi: 10.1176/appi.ajp.159.7.1080.

Cardno, A. G. *et al.* (1999) 'Heritability estimates for psychotic disorders: The Maudsley Twin psychosis series', *Archives of General Psychiatry*, 56(2), pp. 162-168. doi: 10.1001/archpsyc.56.2.162.

Carlsson, A. (2001) 'A paradigm shift in brain research', *Science*. Science, pp. 1021-1024. doi: 10.1126/science.1066969.

Carlsson, A. and Lindqvist, M. (1963) 'Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-Methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain', *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 20(2), pp. 140-144. doi: 10.1111/j.1600-0773.1963.tb01730.x.

CARLSSON, A. and WALDECK, B. (1958) 'A Fluorimetric Method for the Determination of Dopamine (3-Hydroxytyramine.)', *Acta Physiologica Scandinavica*, 44(3-4), pp. 293-298. doi: 10.1111/j.1748-1716.1958.tb01628.x.

- Carriba, P. *et al.* (2007) 'Striatal adenosine A_{2A} and cannabinoid CB₁ receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids', *Neuropsychopharmacology*, 32(11), pp. 2249–2259. doi: 10.1038/sj.npp.1301375.
- Chang, W. *et al.* (2007) 'Complex formation with the type B γ -aminobutyric acid receptor affects the expression and signal transduction of the extracellular calcium-sensing receptor: Studies with HEK-293 cells and neurons', *Journal of Biological Chemistry*, 282(34), pp. 25030–25040. doi: 10.1074/jbc.M700924200.
- Changeux, J. P. and Christopoulos, A. (2016) 'Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation', *Cell*. Cell Press, pp. 1084–1102. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.015.
- Chen, B. C. and Lin, W. W. (1999) 'PKC β 1 mediates the inhibition of P_{2Y} receptor-induced inositol phosphate formation in endothelial cells', *British Journal of Pharmacology*, 127(8), pp. 1908–1914. doi: 10.1038/sj.bjp.0702727.
- Chen, C. *et al.* (2004) 'Heterodimerization and cross-desensitization between the μ -opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor', *European Journal of Pharmacology*, 483(2–3), pp. 175–186. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.10.033.
- Cheng, F. *et al.* (2017) 'Suppression of Zika virus infection and replication in endothelial cells and astrocytes by PKA inhibitor PKI 14-22', *Journal of Virology*, p. JVI.02019-17. doi: 10.1128/jvi.02019-17.
- Cherezov, V. *et al.* (2007) 'High-resolution crystal structure of an engineered human β ₂-adrenergic G protein-coupled receptor', *Science*, 318(5854), pp. 1258–1265. doi: 10.1126/science.1150577.
- Christopoulos, A. *et al.* (2014) 'International union of basic and clinical pharmacology. XC. Multisite pharmacology: Recommendations for the nomenclature of receptor allosterism and allosteric ligands', *Pharmacological Reviews*, 66(4), pp. 918–947. doi: 10.1124/pr.114.008862.
- Cichewicz, D. L. (2004) 'Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics', *Life Sciences*. Elsevier Inc., pp. 1317–1324. doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.038.
- Ciruela, F. *et al.* (2001) 'Metabotropic Glutamate 1 α and Adenosine A₁ Receptors Assemble into Functionally Interacting Complexes', *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), pp. 18345–18351. doi: 10.1074/jbc.M006960200.

Ciruela, F. *et al.* (2006) 'Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A₁-A_{2A} receptor heteromers', *Journal of Neuroscience*, 26(7), pp. 2080–2087. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3574-05.2006.

Clapham, D. E. (2007) 'Calcium Signaling', *Cell*, pp. 1047–1058. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.028.

De Clerck, F. *et al.* (1984) 'Evidence for functional 5-HT₂ receptor sites on human blood platelets', *Biochemical Pharmacology*, 33(17), pp. 2807–2811. doi: 10.1016/0006-2952(84)90699-3.

Congreve, M. *et al.* (2020) 'Impact of GPCR Structures on Drug Discovery', *Cell*. Cell Press, pp. 81–91. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.003.

Coyle, J. T. (2006) 'Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis.', *Cellular and molecular neurobiology*. Cell Mol Neurobiol, pp. 365–384. doi: 10.1007/s10571-006-9062-8.

Crilly, J. (2007) 'The history of clozapine and its emergence in the US market: A review and analysis', *History of Psychiatry*. Hist Psychiatry, pp. 39–60. doi: 10.1177/0957154X07070335.

Culm, K. E. *et al.* (2004) 'Repeated quinpirole treatment increases cAMP-dependent protein kinase activity and CREB phosphorylation in nucleus accumbens and reverses quinpirole-induced sensorimotor gating deficits in rats', *Neuropsychopharmacology*, 29(10), pp. 1823–1830. doi: 10.1038/sj.npp.1300483.

Dalton, G. D. *et al.* (2005) 'Alterations in brain Protein Kinase A activity and reversal of morphine tolerance by two fragments of native Protein Kinase A inhibitor peptide (PKI)', *Neuropharmacology*, 48(5), pp. 648–657. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.12.006.

Deakin, J., Lennox, B. R. and Zandi, M. S. (2014) 'Antibodies to the N-methyl-D-aspartate receptor and other synaptic proteins in psychosis', *Biological Psychiatry*. Biol Psychiatry, pp. 284–291. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.07.018.

Dhyani, V. *et al.* (2020) 'GPCR mediated control of calcium dynamics: A systems perspective', *Cellular Signalling*. Elsevier Inc., p. 109717. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109717.

Dodge, K. L. and Sanborn, B. M. (1998) 'Evidence for inhibition by protein kinase A of receptor/G α (q)/phospholipase C (PLC) coupling by a mechanism not involving PLC(β 2)', *Endocrinology*, 139(5), pp. 2265–2271. doi: 10.1210/endo.139.5.5963.

- Dold, M. and Leucht, S. (2014) 'Pharmacotherapy of treatment-resistant schizophrenia: A clinical perspective', *Evidence-Based Mental Health*. BMJ Publishing Group, pp. 33-37. doi: 10.1136/eb-2014-101813.
- Downes, G. B. and Gautam, N. (1999) 'The G protein subunit gene families', *Genomics*, 62(3), pp. 544-552. doi: 10.1006/geno.1999.5992.
- Duc, N. M., Kim, H. R. and Chung, K. Y. (2015) 'Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor', *European Journal of Pharmacology*, 763, pp. 214-222. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.016.
- Dupré, D. J. *et al.* (2009) 'The role of G $\beta\gamma$ subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, pp. 31-56. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-061008-103038.
- Dwivedi, Y., Rizavi, H. S. and Pandey, G. N. (2002) 'Differential effects of haloperidol and clozapine on [3 H]cAMP binding, protein kinase A (PKA) activity, and mRNA and protein expression of selective regulatory and catalytic subunit isoforms of PKA in rat brain', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(1), pp. 197-209. doi: 10.1124/jpet.301.1.197.
- East, S. Z. *et al.* (2002) 'An RT-PCR study of 5-HT $_6$ and 5-HT $_7$ receptor mRNAs in the hippocampal formation and prefrontal cortex in schizophrenia', *Schizophrenia Research*, 57(1), pp. 15-26. doi: 10.1016/S0920-9964(01)00323-1.
- Ehlert, F. J. (1988) 'Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods.', *Molecular Pharmacology*, 33(2).
- Einhauser, A. and Jungbauer, A. (2001) 'The FLAGTM peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins', *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. J Biochem Biophys Methods, pp. 455-465. doi: 10.1016/S0165-022X(01)00213-5.
- Farber, N. B. (2003) 'The NMDA Receptor Hypofunction Model of Psychosis', in *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, pp. 119-130. doi: 10.1196/annals.1300.008.
- Farrens, D. L. *et al.* (1996) 'Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin', *Science*, 274(5288), pp. 768-770. doi: 10.1126/science.274.5288.768.

Ferré, S. (2015) 'The GPCR heterotetramer: Challenging classical pharmacology', *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 145–152. doi: 10.1016/j.tips.2015.01.002.

Finley, M. J. *et al.* (2008) 'Bi-directional heterologous desensitization between the major HIV-1 co-receptor CXCR4 and the κ -opioid receptor', *Journal of Neuroimmunology*, 197(2), pp. 114–123. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.021.

Fiorella, D., Rabin, R. A. and Winter, J. C. (1995) 'The role of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in the stimulus effects of hallucinogenic drugs I: Antagonist correlation analysis', *Psychopharmacology*, 121(3), pp. 347–356. doi: 10.1007/BF02246074.

Forero, D. A. *et al.* (2016) 'A network of synaptic genes associated with schizophrenia and bipolar disorder', *Schizophrenia Research*, 172(1–3), pp. 68–74. doi: 10.1016/j.schres.2016.02.012.

Fredriksson, R. *et al.* (2003) 'The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints', *Molecular Pharmacology*, 63(6), pp. 1256–1272. doi: 10.1124/mol.63.6.1256.

Fukaya, M. *et al.* (2008) 'Predominant expression of phospholipase C β 1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close association with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements', *European Journal of Neuroscience*, 28(9), pp. 1744–1759. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06495.x.

Fuxe, K. *et al.* (2014) 'Dopamine D₂ heteroreceptor complexes and their receptor-receptor interactions in ventral striatum: Novel targets for antipsychotic drugs', in *Progress in Brain Research*. Elsevier B.V., pp. 113–139. doi: 10.1016/B978-0-444-63425-2.00005-2.

Gaebel, W. and Zielasek, J. (2015) 'Schizophrenia in 2020: Trends in diagnosis and therapy', *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. Blackwell Publishing, pp. 661–673. doi: 10.1111/pcn.12322.

Galici, R. *et al.* (2008) 'Effects of SB-269970, a 5-HT₇ receptor antagonist, in mouse models predictive of antipsychotic-like activity', *Behavioural Pharmacology*, 19(2), pp. 153–159. doi: 10.1097/FBP.0b013e3282f62d8c.

García-Bea, A. *et al.* (2019) 'Serotonin 5-HT_{2A} receptor expression and functionality in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: Selective

biased agonism via $G\alpha_{i1}$ -proteins', *European Neuropsychopharmacology*, 29(12), pp. 1453-1463. doi: 10.1016/j.euroneuro.2019.10.013.

García-Morales, V., Luaces-Regueira, M. and Campos-Toimil, M. (2017) 'The cAMP effectors PKA and Epac activate endothelial NO synthase through PI3K/Akt pathway in human endothelial cells', *Biochemical Pharmacology*, 145, pp. 94-101. doi: 10.1016/j.bcp.2017.09.004.

García-Nafria, J. and Tate, C. G. (2019) 'Cryo-EM structures of GPCRs coupled to G_s , G_i and G_o ', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 1-13. doi: 10.1016/j.mce.2019.02.006.

Giros, B. *et al.* (1989) 'Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms', *Nature*, 342(6252), pp. 923-926. doi: 10.1038/342923a0.

Goff, D. C. and Coyle, J. T. (2001) 'The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia', *American Journal of Psychiatry*. Am J Psychiatry, pp. 1367-1377. doi: 10.1176/appi.ajp.158.9.1367.

Gómez, S. (2017) *ESTUDIO IN VITRO DE LA INFLUENCIA DEL HETERODÍMERO DE LOS RECEPTORES D₂ DE DOPAMINA Y 5-HT_{2A} DE SEROTONINA, EN APLICACIÓN A LA FARMACOTERAPIA ANTIPSICÓTICA*. Universidad de Santiago de Compostela. Available at: <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/15602> (Accessed: 6 April 2021).

González-Maeso, J. *et al.* (2007) 'Hallucinogens Recruit Specific Cortical 5-HT_{2A} Receptor-Mediated Signaling Pathways to Affect Behavior', *Neuron*, 53(3), pp. 439-452. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.008.

González-Maeso, J. *et al.* (2008) 'Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis', *Nature*, 452(7183), pp. 93-97. doi: 10.1038/nature06612.

Gonzalez, G. A. and Montminy, M. R. (1989) 'Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133', *Cell*, 59(4), pp. 675-680. doi: 10.1016/0092-8674(89)90013-5.

Gorbunova, Y. V. and Spitzer, N. C. (2002) 'Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca²⁺ spikes', *Nature*, 418(6893), pp. 93-96. doi: 10.1038/nature00835.

Grimes, M. T. *et al.* (2015) 'Epac activation initiates associative odor preference memories in the rat pup', *Learning and Memory*, 22(2), pp. 74–82. doi: 10.1101/lm.037101.114.

Guest, P. C. *et al.* (2000) 'Identification and characterization of a truncated variant of the 5- hydroxytryptamine_{2A} receptor produced by alternative splicing 1', *Brain Research*, 876(1–2), pp. 238–244. doi: 10.1016/S0006-8993(00)02664-0.

Guo, Q. *et al.* (2017) 'Physiological crosstalk between the AC/PKA and PLC/PKC pathways modulates melatonin-mediated, monochromatic-light-induced proliferation of T-lymphocytes in chickens', *Cell and Tissue Research*, 369(3), pp. 555–565. doi: 10.1007/s00441-017-2644-6.

Gupta, S. K. and Mishra, R. K. (1992) 'Effects of chronic treatment of haloperidol and clozapine on levels of G-protein subunits in rat striatum.', *Journal of molecular neuroscience : MN*, 3(4), pp. 197–201. doi: 10.1007/BF03380139.

Habib, S. L. *et al.* (2015) 'Novel mechanism of transcriptional regulation of cell matrix protein through CREB', *Cell Cycle*, 14(16), pp. 2598–2608. doi: 10.1080/15384101.2015.1064204.

Harmar, A. J. (2001) 'Family-B G-protein-coupled receptors', *Genome Biology*. *Genome Biol.* doi: 10.1186/gb-2001-2-12-reviews3013.

Hauser, A. S. *et al.* (2017) 'Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications', *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(12). doi: 10.1038/nrd.2017.178.

Heidmann, D. E. A. *et al.* (1997) 'Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: Species differences due to altered intron- exon organization', *Journal of Neurochemistry*, 68(4), pp. 1372–1381. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68041372.x.

Henquet, C. *et al.* (2005) 'The environment and schizophrenia: The role of cannabis use', *Schizophrenia Bulletin*, 31(3), pp. 608–612. doi: 10.1093/schbul/sbio27.

Herenbrink, C. K. *et al.* (2016) 'The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs', *Nature Communications*, 7. doi: 10.1038/ncomms10842.

Herold, S. *et al.* (2011) 'CREB signalling regulates early survival, neuronal gene expression and morphological development in adult subventricular zone neurogenesis', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(1), pp. 79–88. doi: 10.1016/j.mcn.2010.08.008.

- Hiroi, N. *et al.* (2013) 'Copy number variation at 22q11.2: From rare variants to common mechanisms of developmental neuropsychiatric disorders', *Molecular Psychiatry*. Mol Psychiatry, pp. 1153–1165. doi: 10.1038/mp.2013.92.
- Hirsch, L. *et al.* (2017) 'Second-Generation Antipsychotics and Metabolic Side Effects: A Systematic Review of Population-Based Studies', *Drug Safety*. Springer International Publishing, pp. 771–781. doi: 10.1007/s40264-017-0543-0.
- Hounsou, C. *et al.* (2015) 'Time-resolved FRET binding assay to investigate hetero-oligomer binding properties: Proof of concept with dopamine D1/D3 heterodimer', *ACS Chemical Biology*, 10(2), pp. 466–474. doi: 10.1021/cb5007568.
- Humphrey, P. P. A., Hartig, P. and Hoyer, D. (1993) 'A proposed new nomenclature for 5-HT receptors', *Trends in Pharmacological Sciences*. Trends Pharmacol Sci, pp. 233–236. doi: 10.1016/0165-6147(93)90016-D.
- Inoue, M. *et al.* (2003) '5-HT₇ receptor-mediated relaxation of the oviduct in nonpregnant proestrus pigs', *European Journal of Pharmacology*, 461(2–3), pp. 207–218. doi: 10.1016/S0014-2999(03)01312-8.
- Isberg, V. *et al.* (2016) 'GPCRdb: An information system for G protein-coupled receptors', *Nucleic Acids Research*, 44(D1), pp. D356–D364. doi: 10.1093/nar/gkv1178.
- Isensee, J. *et al.* (2018) 'PKA-RII subunit phosphorylation precedes activation by cAMP and regulates activity termination', *J. Cell Biol*, 217(6), pp. 2167–2184. doi: 10.1083/jcb.201708053.
- Iversen, S. D. and Iversen, L. L. (2007) 'Dopamine: 50 years in perspective', *Trends in Neurosciences*. Trends Neurosci, pp. 188–193. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.002.
- Jablensky, A. *et al.* (1992) 'Schizophrenia: manifestations, incidence and course in different cultures A World Health Organization Ten-Country Study', *Psychological Medicine. Monograph Supplement*, 20, pp. 1–97. doi: 10.1017/s0264180100000904.
- Jablensky, A. (2000) 'Epidemiology of schizophrenia: The global burden of disease and disability', *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 250(6), pp. 274–285. doi: 10.1007/s004060070002.
- Jähnichen, S., Glusa, E. and Pertz, H. H. (2005) 'Evidence for 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptor-mediated relaxation in pulmonary arteries of weaned pigs', *Naunyn-*

Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 371(1), pp. 89–98. doi: 10.1007/s00210-004-1006-6.

Janssen, P. *et al.* (2005) 'Characterization of 5-HT₇-receptor-mediated gastric relaxation in conscious dogs', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(1 52-1). doi: 10.1152/ajpgi.00012.2005.

Johnson, M. S. *et al.* (2003) 'Functional interactions between native Gs-coupled 5-HT receptors in HEK-293 cells and the heterologously expressed serotonin transporter', *Cellular Signalling*, 15(8), pp. 803–811. doi: 10.1016/S0898-6568(03)00013-5.

Kachroo, A. *et al.* (2005) 'Interactions between metabotropic glutamate 5 and adenosine A_{2A} receptors in normal and parkinsonian mice', *Journal of Neuroscience*, 25(45), pp. 10414–10419. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3660-05.2005.

Kahn, R. S. *et al.* (2015) 'Schizophrenia', *Nature Reviews Disease Primers*, 1. doi: 10.1038/nrdp.2015.67.

Kamal, M. *et al.* (2011) 'Biological significance of GPCR heteromerization in the neuro-endocrine system GPCR oligomers, what are they Good for?', 2(1). doi: 10.3389/fendo.2011.00002.

Kaplan, G. B., Leite-Morris, K. A. and J. Keith, D. (1999) 'Differential effects of treatment with typical and atypical antipsychotic drugs on adenylyl cyclase and G proteins', *Neuroscience Letters*, 273(3), pp. 147–150. doi: 10.1016/S0304-3940(99)00610-2.

Kapur, S. and Remington, G. (1996) 'Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia', *American Journal of Psychiatry*. American Psychiatric Association, pp. 466–476. doi: 10.1176/ajp.153.4.466.

Katada, T. (2012) *The Inhibitory G Protein G_i Identified as Pertussis Toxin-Catalyzed ADP-Ribosylation*, *Biol. Pharm. Bull.*

Kearn, C. S. *et al.* (2005) 'Concurrent stimulation of cannabinoid CB₁ and dopamine D₂ receptors enhances heterodimer formation: A mechanism for receptor cross-talk?', *Molecular Pharmacology*, 67(5), pp. 1697–1704. doi: 10.1124/mol.104.006882.

Kenakin, T. (1996) 'The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems', *Pharmacological Reviews*. Pharmacol Rev, pp. 413–451. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8888308/> (Accessed: 15 February 2021).

Kenakin, T. (2004a) 'G-protein coupled receptors as allosteric machines', *Receptors and Channels*, 10(2), pp. 51–60. doi: 10.1080/10606820490464316.

Kenakin, T. (2004b) 'Principles: Receptor theory in pharmacology', *Trends in Pharmacological Sciences*. Trends Pharmacol Sci, pp. 186–192. doi: 10.1016/j.tips.2004.02.012.

Kenakin, T. (2005) 'New concepts in drug discovery: Collateral efficacy and permissive antagonism', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nat Rev Drug Discov, pp. 919–927. doi: 10.1038/nrd1875.

Kenakin, T. (2011) 'Functional selectivity and biased receptor signaling', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. J Pharmacol Exp Ther, pp. 296–302. doi: 10.1124/jpet.110.173948.

Kenakin, T. P. and Miller, L. J. (2010) 'Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: The impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery', *Pharmacological Reviews*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, pp. 265–304. doi: 10.1124/pr.108.000992.

Kimura, K. T. *et al.* (2019) 'Structures of the 5-HT 2A receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine', *Nature Structural and Molecular Biology*, 26(2), pp. 121–128. doi: 10.1038/s41594-018-0180-z.

Kitaoka, S. *et al.* (2007) 'Prostaglandin E2 acts on EP1 receptor and amplifies both dopamine D1 and D2 receptor signaling in the striatum', *Journal of Neuroscience*, 27(47), pp. 12900–12907. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3257-07.2007.

Klein, M. O. *et al.* (2019) 'Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases', *Cellular and Molecular Neurobiology*. Springer New York LLC, pp. 31–59. doi: 10.1007/s10571-018-0632-3.

Knight, J. A. *et al.* (2009) 'Pharmacological analysis of the novel, rapid, and potent inactivation of the human 5-hydroxytryptamine 7 receptor by risperidone, 9-OH-risperidone, and other inactivating antagonists', *Molecular Pharmacology*, 75(2), pp. 374–380. doi: 10.1124/mol.108.052084.

Komatsu, H. (2015) 'Novel therapeutic GPCRS for psychiatric disorders', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), pp. 14109–14121. doi: 10.3390/ijms160614109.

Kozasa, T. *et al.* (1998) 'p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Gα12 and Gα13', *Science*. Science, pp. 2109–2111. doi: 10.1126/science.280.5372.2109.

Kufareva, I. *et al.* (2011) 'Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment', *Structure*, 19(8), pp. 1108–1126. doi: 10.1016/j.str.2011.05.012.

Kuo, I. Y. *et al.* (2014) 'Decreased polycystin 2 expression alters calcium-contraction coupling and changes β -adrenergic signaling pathways', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(46), pp. 16604–16609. doi: 10.1073/pnas.1415933111.

Kurrasch-Orbaugh, D. M. *et al.* (2003) 'A complex signaling cascade links the serotonin_{2A} receptor to phospholipase A₂ activation: The involvement of MAP kinases', *Journal of Neurochemistry*, 86(4), pp. 980–991. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01921.x.

Kvachnina, E. *et al.* (2005) '5-HT₇ receptor is coupled to G α subunits of heterotrimeric G₁₂-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology', *Journal of Neuroscience*, 25(34), pp. 7821–7830. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1790-05.2005.

L, F. *et al.* (2020) 'Haloperidol bound D₂ dopamine receptor structure inspired the discovery of subtype selective ligands', *Nature communications*, 11(1). doi: 10.1038/S41467-020-14884-Y.

Lawler, C. P. *et al.* (1999) 'Interactions of the novel antipsychotic aripiprazole (OPC-14597) with dopamine and serotonin receptor subtypes', *Neuropsychopharmacology*, 20(6), pp. 612–627. doi: 10.1016/S0893-133X(98)00099-2.

De Lean, A., Stadel, J. M. and Lefkowitz, R. J. (1980) *A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptor.*, *OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. doi: 10.1016/S0021-9258(20)79672-9.

Lee, K. W. *et al.* (2002) 'Impaired D₂ dopamine receptor function in mice lacking type 5 adenylyl cyclase', *Journal of Neuroscience*, 22(18), pp. 7931–7940. doi: 10.1523/jneurosci.22-18-07931.2002.

Lee, S. P. *et al.* (2004) 'Dopamine D₁ and D₂ receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal', *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), pp. 35671–35678. doi: 10.1074/jbc.M401923200.

Leff, P. (1995) 'The two-state model of receptor activation', *Trends in Pharmacological Sciences*, 16(3), pp. 89–97. doi: 10.1016/S0165-6147(00)88989-0.

- Lefkowitz, R. J. *et al.* (1993) 'Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins', *Trends in Pharmacological Sciences*. Trends Pharmacol Sci, pp. 303–307. doi: 10.1016/0165-6147(93)90048-O.
- Leysen, J. E. (2004) '5-HT₂ receptors', *Current Drug Targets: CNS and Neurological Disorders*. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, pp. 11–26. doi: 10.2174/1568007043482598.
- Lieberman, J. A. (2004) 'Dopamine partial agonists: A new class of antipsychotic', *CNS Drugs*. CNS Drugs, pp. 251–267. doi: 10.2165/00023210-200418040-00005.
- Limbird, L. E., Meyts, P. De and Lefkowitz, R. J. (1975) 'β-Adrenergic receptors: Evidence for negative cooperativity', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 64(4), pp. 1160–1168. doi: 10.1016/0006-291X(75)90815-3.
- Lin, S. L. *et al.* (2003) 'Coupling of neuronal 5-HT₇ receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A-independent pathway that can utilize Epac', *Journal of Neurochemistry*, 87(5), pp. 1076–1085. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02076.x.
- Liu, J. J. *et al.* (2012) 'Biased signaling pathways in β₂-adrenergic receptor characterized by 19F-NMR', *Science*, 335(6072), pp. 1106–1110. doi: 10.1126/science.1215802.
- Liu, M. and Simon, M. I. (1996a) 'Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C', *Nature*, 382(6586), pp. 83–87. doi: 10.1038/382083ao.
- Liu, M. and Simon, M. I. (1996b) 'Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C', *Nature*, 382(6586), pp. 83–87. doi: 10.1038/382083ao.
- López-Muñoz, F. *et al.* (2005) 'History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine', *Annals of Clinical Psychiatry*. Ann Clin Psychiatry, pp. 113–135. doi: 10.1080/10401230591002002.
- Lovenberg, T. W. *et al.* (1993) 'A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms', *Neuron*, 11(3), pp. 449–458. doi: 10.1016/0896-6273(93)90149-L.
- Lu, M. and Wu, B. (2016) 'Structural studies of G protein-coupled receptors', *IUBMB Life*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 894–903. doi: 10.1002/iub.1578.

Łukasiewicz, S. *et al.* (2010) 'Hetero-dimerization of serotonin 5-HT₂A and dopamine D₂ receptors', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1803(12), pp. 1347-1358. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.08.010.

Łukasiewicz, S. *et al.* (2011) 'Effect of clozapine on the dimerization of serotonin 5-HT₂A receptor and its genetic variant 5-HT₂AH425Y with dopamine D₂ receptor', *European Journal of Pharmacology*, 659(2-3), pp. 114-123. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.03.038.

Luttrell, L. M. and Kenakin, T. P. (2011) 'Refining efficacy: Allosterism and bias in G protein-coupled receptor signaling', *Methods in Molecular Biology*, 756, pp. 3-35. doi: 10.1007/978-1-61779-160-4_1.

Mahmood, D. (2016) 'Histamine H₃ Receptors and Its Antagonism as a Novel Mechanism for Antipsychotic Effect: A Current Preclinical and Clinical Perspective', *International Journal of Health Sciences*, 10(4), pp. 543-554. doi: 10.12816/0048906.

Manni, S. *et al.* (2008) 'Phosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunit modulates PKA-AKAP interaction, substrate phosphorylation, and calcium signaling in cardiac cells', *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), pp. 24145-24154. doi: 10.1074/jbc.M802278200.

Maric, N. P. *et al.* (2016) 'Improving Current Treatments for Schizophrenia', *Drug Development Research*, 77(7), pp. 357-367. doi: 10.1002/ddr.21337.

Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S. (2001) 'G-protein-coupled receptors and signaling networks: Emerging paradigms', *Trends in Pharmacological Sciences*. Trends Pharmacol Sci, pp. 368-376. doi: 10.1016/S0165-6147(00)01678-3.

Maroteaux, L., Béchade, C. and Roumier, A. (2019a) 'Dimers of serotonin receptors: Impact on ligand affinity and signaling', *Biochimie*. Elsevier B.V., pp. 23-33. doi: 10.1016/j.biochi.2019.01.009.

Maroteaux, L., Béchade, C. and Roumier, A. (2019b) 'Dimers of serotonin receptors: Impact on ligand affinity and signaling', *Biochimie*. Elsevier B.V., pp. 23-33. doi: 10.1016/j.biochi.2019.01.009.

Marshall, F. H. *et al.* (1999) 'GABA(B) receptors - The first 7TM heterodimers', *Trends in Pharmacological Sciences*. Trends Pharmacol Sci, pp. 396-399. doi: 10.1016/S0165-6147(99)01383-8.

- Masson, J. *et al.* (2012) 'Serotonergic signaling: Multiple effectors and pleiotropic effects', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1(6), pp. 685-713. doi: 10.1002/wmts.50.
- Matsumoto, T. *et al.* (2013) 'Protein Kinase C Inhibitor Generates Stable Human Tolerogenic Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 191(5), pp. 2247-2257. doi: 10.4049/jimmunol.1203053.
- Matthys, A. *et al.* (2011) 'Role of the 5-HT₇ Receptor in the Central Nervous System: from Current Status to Future Perspectives', *Molecular Neurobiology*, 43(3), pp. 228-253. doi: 10.1007/s12035-011-8175-3.
- McGuffin, P., Owen, M. J. and Farmer, A. E. (1995) 'Genetic basis of schizophrenia', *The Lancet*, 346(8976), pp. 678-682. doi: 10.1016/S0140-6736(95)92285-7.
- De Mei, C. *et al.* (2009) 'Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D₂ receptors', *Current Opinion in Pharmacology*. Curr Opin Pharmacol, pp. 53-58. doi: 10.1016/j.coph.2008.12.002.
- Meltzer, H. Y. and Massey, B. W. (2011) 'The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs', *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd, pp. 59-67. doi: 10.1016/j.coph.2011.02.007.
- Meltzer, H. Y., Matsubara, S. and Lee, J. C. (1989) 'Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values.', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 251(1).
- Mijovic, A. and MacCabe, J. H. (2020) 'Clozapine-induced agranulocytosis', *Annals of Hematology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 2477-2482. doi: 10.1007/s00277-020-04215-y.
- Milligan, G. (2004) 'G protein-coupled receptor dimerization: Function and ligand pharmacology', *Molecular Pharmacology*. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET), pp. 1-7. doi: 10.1124/mol.104.000497.
- Missale, C. *et al.* (1998) *Dopamine Receptors: From Structure to Function*, *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*.
- Missale, C. *et al.* (2010) 'The neurobiology of dopamine receptors: Evolution from the dual concept to heterodimer complexes', *Journal of Receptors and Signal Transduction*. J Recept Signal Transduct Res, pp. 347-354. doi: 10.3109/10799893.2010.506192.

Miyakawa, A. *et al.* (2013) *Intracellular calcium release modulates polycystin-2 trafficking*. doi: 10.1186/1471-2369-14-34.

Moller, H. J. (2005) 'Risperidone: A review', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. *Expert Opin Pharmacother*, pp. 803–818. doi: 10.1517/14656566.6.5.803.

Mombaerts, P. (2004) 'Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 263–278. doi: 10.1038/nrn1365.

Mottola, D. M. *et al.* (2002) 'Functional selectivity of dopamine receptor agonists. I. Selective activation of postsynaptic dopamine D₂ receptors linked to adenylate cyclase', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), pp. 1166–1178. doi: 10.1124/jpet.301.3.1166.

Mueser, K. T. and McGurk, S. R. (2004) 'Schizophrenia', in *Lancet*. *Lancet*, pp. 2063–2072. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16458-1.

Nair, A. G., Bhalla, U. S. and Hellgren Kotaleski, J. (2016) 'Role of DARPP-32 and ARPP-21 in the Emergence of Temporal Constraints on Striatal Calcium and Dopamine Integration', *PLoS Computational Biology*, 12(9). doi: 10.1371/journal.pcbi.1005080.

Natarajan, K. and Berk, B. C. (2006) 'Crosstalk coregulation mechanisms of G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. *Methods Mol Biol*, pp. 51–77. doi: 10.1385/1-59745-048-0:51.

Nauck, M. A. *et al.* (2016) 'A phase 2, randomized, dose-finding study of the novel once-weekly human GLP-1 analog, semaglutide, compared with placebo and open-label liraglutide in patients with type 2 diabetes', *Diabetes Care*, 39(2), pp. 231–241. doi: 10.2337/dc15-0165.

Navarro, G. *et al.* (2018) 'Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB₁ and CB₂ receptors and relevance for Alzheimer's disease and levodopa-induced dyskinesia', *Brain, Behavior, and Immunity*, 67, pp. 139–151. doi: 10.1016/j.bbi.2017.08.015.

Needham, E. and Zandi, M. S. (2014) 'Recent advances in the neuroimmunology of cell-surface cns autoantibody syndromes, Alzheimer's disease, Traumatic brain injury and schizophrenia', *Journal of Neurology*, 261(1), pp. 2037–2042. doi: 10.1007/s00415-014-7473-x.

- Neubig, R. R. *et al.* (2003) 'International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology', *Pharmacological Reviews*. Pharmacol Rev, pp. 597-606. doi: 10.1124/pr.55.4.4.
- Neve, K. A., Seamans, J. K. and Trantham-Davidson, H. (2004) 'Dopamine Receptor Signaling', *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 24(3), pp. 165-205. doi: 10.1081/RRS-200029981.
- Neves, S. R., Ram, P. T. and Iyengar, R. (2002) 'G protein pathways', *Science*. Science, pp. 1636-1639. doi: 10.1126/science.1071550.
- Newton, A. C. (2001) 'Protein kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions', *Chemical Reviews*, 101(8), pp. 2353-2364. doi: 10.1021/cr0002801.
- Ni, Q. *et al.* (2011) 'Signaling diversity of PKA achieved via a Ca²⁺ -cAMP-PKA oscillatory circuit', *Nature Chemical Biology*, 7(1), pp. 34-40. doi: 10.1038/nchembio.478.
- Nikiforuk, A. (2015) 'Targeting the serotonin 5-HT₇ receptor in the search for treatments for CNS disorders: Rationale and progress to date', *CNS Drugs*, 29(4), pp. 265-275. doi: 10.1007/s40263-015-0236-0.
- Nishimura, A. *et al.* (2010) 'Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric G_q protein by a small molecule', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), pp. 13666-13671. doi: 10.1073/pnas.1003553107.
- Oldham, W. M. and Hamm, H. E. (2008) 'Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, pp. 60-71. doi: 10.1038/nrm2299.
- Osborne, N. N. (1990) 'Effects of GTP, forskolin, sodium fluoride, serotonin, dopamine, and carbachol on adenylate cyclase in Teleost retina', *Neurochemical Research*, 15(5), pp. 523-528. doi: 10.1007/BF00966211.
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B. and Hopkins, A. L. (2006) 'How many drug targets are there?', *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(12), pp. 993-996. doi: 10.1038/nrd2199.
- Owen, M. J., Sawa, A. and Mortensen, P. B. (2016) 'Schizophrenia', *The Lancet*. Lancet Publishing Group, pp. 86-97. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01121-6.

Palczewski, K. *et al.* (2000) 'Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor', *Science*, 289(5480), pp. 739-745. doi: 10.1126/science.289.5480.739.

Palczewski, K. (2010) 'Oligomeric forms of G protein-coupled receptors (GPCRs)', *Trends in Biochemical Sciences*, 35(11), pp. 595-600. doi: 10.1016/j.tibs.2010.05.002.

Papasergi-Scott, M. M. *et al.* (2020) 'Structures of metabotropic GABAB receptor', *Nature*, 584(7820), pp. 310-314. doi: 10.1038/s41586-020-2469-4.

Peen, J. and Dekker, J. (1997) 'Admission rates for schizophrenia in The Netherlands: An urban/rural comparison', *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 96(4), pp. 301-305. doi: 10.1111/j.1600-0447.1997.tb10167.x.

Phospho PKA R2 (S99) antibody [E151] Recombinant (ab32390) | Abcam (no date). Available at: <https://www.abcam.com/pka-r2pkr2-phospho-s99-antibody-e151-ab32390.html> (Accessed: 31 March 2021).

Pin, J. P. and Acher, F. (2002) 'The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology.', *Current drug targets. CNS and neurological disorders. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, pp. 297-317. doi: 10.2174/1568007023339328.

Pozzi, L. *et al.* (2003a) 'Opposite regulation by typical and atypical anti-psychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum', *J. Neurochem*, p. 10. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01851.x.

Pozzi, L. *et al.* (2003b) 'Opposite regulation by typical and atypical anti-psychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum', *Journal of Neurochemistry*, 86(2), pp. 451-459. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01851.x.

Prasad, S., Ponimaskin, E. and Zeug, A. (2019) 'Serotonin receptor oligomerization regulates cAMP-based signaling', *Journal of cell science*, 132(16). doi: 10.1242/jcs.230334.

Prestwich, S. A. and Bolton, T. B. (1995) 'Inhibition of muscarinic receptor-induced inositol phospholipid hydrolysis by caffeine, β -adrenoceptors and protein kinase C in intestinal smooth muscle', *British Journal of Pharmacology*, 114(3), pp. 602-611. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb17182.x.

Quinn, J. C. *et al.* (2002) 'Activation of extracellular-regulated kinase by 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors in PC12 cells is protein kinase C-independent and

requires calmodulin and tyrosine kinases', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(2), pp. 746–752. doi: 10.1124/jpet.102.038083.

Quynh Doan, N. and Christensen, S. (2015) 'Thapsigargin, Origin, Chemistry, Structure-Activity Relationships and Prodrug Development', *Current Pharmaceutical Design*, 21(38), pp. 5501–5517. doi: 10.2174/1381612821666151002112824.

Rahmeh, R. *et al.* (2012) 'Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), pp. 6733–6738. doi: 10.1073/pnas.1201093109.

Rask-Andersen, M., Masuram, S. and Schiöth, H. B. (2014) 'The druggable genome: Evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Annual Reviews Inc., pp. 9–26. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-135943.

Rasmussen, H. *et al.* (2010) 'Decreased frontal serotonin_{2A} receptor binding in antipsychotic-naïve patients with first-episode schizophrenia', *Archives of General Psychiatry*, 67(1), pp. 9–16. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.176.

Rebois, R. V. *et al.* (2012) 'D₂-like dopamine and β -adrenergic receptors form a signaling complex that integrates G_s- and G_i-mediated regulation of adenylyl cyclase', *Cellular Signalling*, 24(11), pp. 2051–2060. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.06.011.

Recombinant Anti-5HT₇ Receptor antibody [EPR6271] (ab128892) | Abcam (no date). Available at: <https://www.abcam.com/5ht7-receptor-antibody-ep6271-ab128892.html> (Accessed: 6 April 2021).

Recombinant Anti-PKA R2/PKR2 antibody [Y116] KO Tested (ab32514) | Abcam (no date). Available at: <https://www.abcam.com/pka-r2pk2-antibody-y116-ab32514.html#lb> (Accessed: 31 March 2021).

Reed, G. M. *et al.* (2019) 'Innovations and changes in the ICD-11 classification of mental, behavioural and neurodevelopmental disorders', *World Psychiatry*, 18(1), pp. 3–19. doi: 10.1002/wps.20611.

Réus, G. Z. *et al.* (2012) 'The administration of olanzapine and fluoxetine has synergistic effects on intracellular survival pathways in the rat brain', *Journal of Psychiatric Research*, 46(8), pp. 1029–1035. doi: 10.1016/j.jpsychires.2012.04.016.

Ribeiro, E. L. A. *et al.* (2018) 'Efficacy and safety of aripiprazole for the treatment of schizophrenia: an overview of systematic reviews', *European Journal of Clinical Pharmacology*. Springer Verlag, pp. 1215-1233. doi: 10.1007/s00228-018-2498-1.

Ripke, S. *et al.* (2013) 'Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia', *Nature Genetics*, 45(10), pp. 1150-1159. doi: 10.1038/ng.2742.

Rives, M.-L., Vol, C., Fukazawa, Y., Tinel, N., Trinquet, E., Ayoub, M. A., Shigemoto, R., Pin, J.-P. and Pré Zeau, L. (2009) 'Crosstalk between GABA B and mGlu1a receptors reveals new insight into GPCR signal integration', *The EMBO Journal*, 28, pp. 2195-2208. doi: 10.1038/emboj.2009.177.

Rives, M.-L., Vol, C., Fukazawa, Y., Tinel, N., Trinquet, E., Ayoub, M. A., Shigemoto, R., Pin, J.-P. and Prézeau, L. (2009) 'Crosstalk between GABAB and mGlu1a receptors reveals new insight into GPCR signal integration', *The EMBO Journal*, 28(15), pp. 2195-2208. doi: 10.1038/emboj.2009.177.

Rosenbaum, D. M. *et al.* (2007) 'GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β 2-adrenergic receptor function', *Science*, 318(5854), pp. 1266-1273. doi: 10.1126/science.1150609.

Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. and Kobilka, B. K. (2009) 'The structure and function of G-protein-coupled receptors', *Nature*, 459(7245), pp. 356-363. doi: 10.1038/nature08144.

Roth, B. L. *et al.* (1994) 'Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors.', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268(3).

Runnels, L. W. and Scarlata, S. F. (1999) 'Determination of the affinities between heterotrimeric G protein subunits and their phospholipase C- β effectors', *Biochemistry*, 38(5), pp. 1488-1496. doi: 10.1021/bi9821519.

Sadana, R. and Dessauer, C. W. (2009) 'Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: Insights from knockout and overexpression studies', *NeuroSignals*. Neurosignals, pp. 5-22. doi: 10.1159/000166277.

Samamasb, P. *et al.* (1993) *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY A Mutation-induced Activated State of the β -Adrenergic Receptor EXTENDING THE TERNARY COMPLEX MODEL**. doi: 10.1016/S0021-9258(18)53442-6.

- Schertler, G. F. X., Villa, C. and Henderson, R. (1993) 'Projection structure of rhodopsin', *Nature*, 362(6422), pp. 770-772. doi: 10.1038/362770a0.
- Schiöth, H. B. and Fredriksson, R. (2005) 'The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective', in *General and Comparative Endocrinology*. Academic Press Inc., pp. 94-101. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.12.018.
- Scott, J. D. *et al.* (1985) 'Identification of an inhibitory region of the heat-stable protein inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(13), pp. 4379-4383. doi: 10.1073/pnas.82.13.4379.
- Seamon, K. B., Padgett, W. and Daly, J. W. (1981) 'Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(6 I), pp. 3363-3367. doi: 10.1073/pnas.78.6.3363.
- Seasholtz, T. M., Majumdar, M. and Brown, J. H. (1999) 'Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling', *Molecular Pharmacology*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, pp. 949-956. doi: 10.1124/mol.55.6.949.
- Seeman, P. (2006) 'Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. Expert Opin Ther Targets, pp. 515-531. doi: 10.1517/14728222.10.4.515.
- Seeman, P. and Lee, T. (1975) 'Antipsychotic drugs: Direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons', *Science*, 188(4194), pp. 1217-1219. doi: 10.1126/science.1145194.
- Seifert, R. and Wenzel-Seifert, K. (2002) 'Constitutive activity of G-proteins-coupled receptors: Cause of disease and common property of wild-type receptors', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. Springer, pp. 381-416. doi: 10.1007/s00210-002-0588-0.
- Selvaraj, S. *et al.* (2014) 'Alterations in the serotonin system in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Elsevier Ltd, pp. 233-245. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.06.005.
- Shin, C. J. *et al.* (1995) 'Changes in G protein levels in the hippocampus and the striatum of rat brain after chronic treatment with haloperidol and sulpiride', *Neuropharmacology*, 34(10), pp. 1335-1338. doi: 10.1016/0028-3908(95)00117-0.

Silva, C. M. (2004) 'Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis', *Oncogene*. Nature Publishing Group, pp. 8017–8023. doi: 10.1038/sj.onc.1208159.

Skalhegg, B. S. (2000) 'Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA', *Frontiers in Bioscience*, 5(1), p. d678. doi: 10.2741/skalhegg.

Skalhegg, B. S. and Tasken, K. (2000) 'Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. doi: 10.2741/skalhegg.

Skroblin, P. *et al.* (2010) 'Mechanisms of Protein Kinase A Anchoring', in *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc., pp. 235–330. doi: 10.1016/S1937-6448(10)83005-9.

Slusarski, D. C., Corces, V. G. and Moon, R. T. (1997) 'Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling', *Nature*, 390(6658), pp. 410–413. doi: 10.1038/37138.

Smith, C. *et al.* (2006) 'Risperidone irreversibly binds to and inactivates the h5-HT7 serotonin receptor', *Molecular Pharmacology*, 70(4), pp. 1264–1270. doi: 10.1124/mol.106.024612.

Sobhia, M. E. *et al.* (2013) 'Protein kinase C inhibitors: A patent review (2008–2009)', *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. Expert Opin Ther Pat, pp. 1297–1315. doi: 10.1517/13543776.2013.805205.

Srivats, S. *et al.* (2016) 'Sigma1 receptors inhibit store-operated Ca²⁺ entry by attenuating coupling of STIM1 to Orai1', *Journal of Cell Biology*, 213(1), pp. 65–79. doi: 10.1083/jcb.201506022.

STEPHENSON, R. P. (1956) 'A modification of receptor theory.', *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 11(4), pp. 379–393. doi: 10.1111/j.1476-5381.1956.tb00006.x.

Stepnicki, P., Kondej, M. and Kaczor, A. A. (2018) 'Current concepts and treatments of schizophrenia', *Molecules*. MDPI AG. doi: 10.3390/molecules23082087.

Stone, J. M., Morrison, P. D. and Pilowsky, L. S. (2007) 'Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia - A synthesis and selective review',

Journal of Psychopharmacology. J Psychopharmacol, pp. 440–452. doi: 10.1177/0269881106073126.

Streb, H. *et al.* (1983) 'Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate', *Nature*, 306(5938), pp. 67–69. doi: 10.1038/306067a0.

Suh, P. G. *et al.* (1988) 'Cloning and sequence of multiple forms of phospholipase C', *Cell*, 54(2), pp. 161–169. doi: 10.1016/0092-8674(88)90548-X.

Sushma and Mondal, A. C. (2019) 'Role of GPCR signaling and calcium dysregulation in Alzheimer's disease', *Molecular and Cellular Neuroscience*. Academic Press Inc. doi: 10.1016/j.mcn.2019.103414.

Svejda, B. *et al.* (2013) 'Serotonin and the 5-HT₇ receptor: The link between hepatocytes, IGF-1 and small intestinal neuroendocrine tumors', *Cancer Sci*, 104(7), pp. 844–855. doi: 10.1111/cas.12174.

Syrovatkina, V. *et al.* (2016) 'Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, pp. 3850–3868. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.002.

Szlachta, M. *et al.* (2018) 'Repeated Clozapine Increases the Level of Serotonin 5-HT_{1A}R Heterodimerization with 5-HT_{2A} or Dopamine D₂ Receptors in the Mouse Cortex', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, p. 40. doi: 10.3389/fnmol.2018.00040.

Takasaki, J. *et al.* (2004) 'A novel Gα_{q/11}-selective inhibitor', *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), pp. 47438–47445. doi: 10.1074/jbc.M408846200.

Takei, N. *et al.* (1996) 'Relationship between in utero exposure to influenza epidemics and risk of schizophrenia in Denmark', *Biological Psychiatry*, 40(9), pp. 817–824. doi: 10.1016/0006-3223(95)00592-7.

Tamura, M. *et al.* (1982) 'Subunit Structure of Islet-Activating Protein, Pertussis Toxin, in Conformity with the A-B Model', *Biochemistry*, 21(22), pp. 5516–5522. doi: 10.1021/bi00265a021.

Taniguchi, M. *et al.* (2003) 'YM-254890, a novel platelet aggregation inhibitor produced by chromobacterium sp. QS3666', *Journal of Antibiotics*, 56(4), pp. 358–363. doi: 10.7164/antibiotics.56.358.

Tanzarella, P. *et al.* (2019) 'Increased Levels of cAMP by the Calcium-Dependent Activation of Soluble Adenylyl Cyclase in Parkin-Mutant Fibroblasts', *Cells*, 8(3), p. 250. doi: 10.3390/cells8030250.

Taussig, R. *et al.* (1994) *THE JOURNAL OF BIO ~ I C A L CHEMISTRY Distinct Patterns of Bidirectional Regulation of Mammalian Adenylyl Cyclases**, *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1016/S0021-9258(17)37574-9.

Thi, N. *et al.* (2015) 'Targeting thapsigargin towards tumors HHS Public Access', *Steroids*, 97, pp. 2-7. doi: 10.1016/j.steroids.2014.07.009.

Thomas, H. V. *et al.* (2001) 'Obstetric complications and risk of schizophrenia: Effect of gender, age at diagnosis and maternal history of psychosis', *British Journal of Psychiatry*, 179(NOV.), pp. 409-414. doi: 10.1192/bjp.179.5.409.

Torres-Quesada, O., Mayrhofer, J. E. and Stefan, E. (2017) 'The many faces of compartmentalized PKA signalosomes', *Cellular Signalling*. Elsevier Inc., pp. 1-11. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.05.012.

Uhlén, M. *et al.* (2015) 'Tissue-based map of the human proteome', *Science*, 347(6220). doi: 10.1126/science.1260419.

Vahia, V. N. (2013) 'Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5: A quick glance', *Indian Journal of Psychiatry*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, pp. 220-223. doi: 10.4103/0019-5545.117131.

Vallone, D., Picetti, R. and Borrelli, E. (2000) 'Structure and function of dopamine receptors', in *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. *Neurosci Biobehav Rev*, pp. 125-132. doi: 10.1016/S0149-7634(99)00063-9.

Vanhoenacker, P., Haegeman, G. and Leysen, J. E. (2000) '5-HT₇ receptors: Current knowledge and future prospects', *Trends in Pharmacological Sciences*. *Trends Pharmacol Sci*, pp. 70-77. doi: 10.1016/S0165-6147(99)01432-7.

Varnäs, K. *et al.* (2004) 'Distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain: A preliminary autoradiographic study using [3H]SB-269970', *Neuroscience Letters*, 367(3), pp. 313-316. doi: 10.1016/j.neulet.2004.06.025.

Venkatakrisnan, A. J. *et al.* (2013) 'Molecular signatures of G-protein-coupled receptors', *Nature*. *Nature*, pp. 185-194. doi: 10.1038/nature11896.

Violin, J. D. *et al.* (2014) 'Biased ligands at G-protein-coupled receptors: Promise and progress', *Trends in Pharmacological Sciences*. doi: 10.1016/j.tips.2014.04.007.

- Wacker, D. *et al.* (2013) 'Structural features for functional selectivity at serotonin receptors', *Science*, 340(6132), pp. 615–619. doi: 10.1126/science.1232808.
- Wacker, D. *et al.* (2017) 'Crystal Structure of an LSD-Bound Human Serotonin Receptor', *Cell*, 168(3), pp. 377–389.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.033.
- Wacker, D., Stevens, R. C. and Roth, B. L. (2017) 'How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.009.
- Wang, W., Qiao, Y. and Li, Z. (2018) 'New Insights into Modes of GPCR Activation', *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 367–386. doi: 10.1016/j.tips.2018.01.001.
- Waters, K. A. *et al.* (2012) 'Effects of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 in animal models of psychosis and cognition', *Behavioural Brain Research*, 228(1), pp. 211–218. doi: 10.1016/j.bbr.2011.12.009.
- Werner, F. M. and Coveñas, R. (2014) 'Safety of antipsychotic drugs: Focus on therapeutic and adverse effects', *Expert Opinion on Drug Safety*. Informa Healthcare, pp. 1031–1042. doi: 10.1517/14740338.2014.935761.
- Van Der Westhuizen, E. T. *et al.* (2015) 'Endogenous allosteric modulators of G protein-coupled receptors', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, pp. 246–260. doi: 10.1124/jpet.114.221606.
- Wilkinson, S. E., Parker, P. J. and Nixon, J. S. (1993) *Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C*, *Biochem. J.*
- Wong, S. K. F. and Martin, B. R. (1983) 'The role of a guanine nucleotide-binding protein in the activation of rat liver plasma-membrane adenylate cyclase by forskolin', *Biochemical Journal*, 216(3), pp. 753–759. doi: 10.1042/bj2160753.
- Wrzal, P. K. *et al.* (2012) 'Allosteric interactions between the oxytocin receptor and the β 2-adrenergic receptor in the modulation of ERK1/2 activation are mediated by heterodimerization', *Cellular Signalling*, 24(1), pp. 342–350. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.09.020.
- Xu, B. *et al.* (2012) 'De novo gene mutations highlight patterns of genetic and neural complexity in schizophrenia', *Nature Genetics*, 44(12), pp. 1365–1369. doi: 10.1038/ng.2446.

Yamamoto, M. *et al.* (1978) *Characterization of Cyclic Nucleotide-Independent Protein Kinase Produced Enzymatically from Its Proenzyme by Calcium-Dependent Neutral Protease from Rat Liver*, *J. Biochem.*

Yang, Y. R. *et al.* (2016) 'Primary phospholipase C and brain disorders', *Advances in Biological Regulation*. Elsevier Ltd, pp. 80–85. doi: 10.1016/j.jbior.2015.11.003.

Yuan, W. *et al.* (2020) 'Prewaning Paternal Deprivation Impacts Parental Responses to Pups and Alters the Serum Oxytocin and Corticosterone Levels and Oxytocin Receptor, Vasopressin 1A Receptor, Oestrogen Receptor, Dopamine Type I Receptor, Dopamine Type II Receptor Levels in Relevant Brain Regions in Adult Mandarin Voles', *Neuroendocrinology*, 110(3–4), pp. 292–306. doi: 10.1159/000501798.

Zhang, S. *et al.* (1996) 'A C-terminal mutant of the G protein β subunit deficient in the activation of phospholipase C- β ', *Journal of Biological Chemistry*, 271(33), pp. 20208–20212. doi: 10.1074/jbc.271.33.20208.

Zhang, X. *et al.* (2005) 'Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), pp. 4459–4464. doi: 10.1073/pnas.0501076102.

IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY. Available at: <https://www.guidetopharmacology.org>.

Textbook of Receptor Pharmacology, Third Edition (2003). Edited by John C. Foreman, Torben and Johansen Alasdair J. Gibb. *CRC Press*.

Declaración de conflicto de interés

La autora declara que no existe ningún tipo de conflicto de interés en relación con la presente tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, Julio 2021



Laura Gómez García

